



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA

Departamento de Patoloxía Animal

**EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD Y
VIALIDAD DEL SEMEN BOVINO
MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS
CASA Y CITOMETRÍA DE FLUJO:
IDENTIFICACIÓN DE
SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS**

Tesis presentada para la obtención del grado de doctor por:

RODRIGO MUIÑO OTERO

:

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	4
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA	7
1. Obtención y Evaluación del semen bovino	8
1.1. Recogida del semen	8
1.2. Volumen del eyaculado y concentración espermática.....	9
1.3. Evaluación de la calidad del semen	10
1.3.1. Motilidad Espermática.....	11
1.3.1.1. Aspectos fisiológicos de la motilidad espermática.....	11
1.3.1.1.1. Estructura de la cola	11
1.3.1.1.2. Mecanismo que permite la motilidad espermática	13
1.3.1.1.3. Metabolismo espermático.....	13
1.3.1.1.4. Adquisición del movimiento espermático	14
1.3.1.2. Evaluación subjetiva de la motilidad espermática.....	15
1.3.1.3. Evaluación de la motilidad mediante el uso de sistemas CASA	16
1.3.1.3.1. Definición de los parámetros medidos por el CASA	17
1.3.1.3.2. Identificación de subpoblaciones espermáticas.....	19
1.3.1.3.3. Algunos inconvenientes de los sistemas CASA.....	20
1.3.2. Morfología Espermática	21
1.3.3. Citometría de flujo: métodos aplicados al análisis de los espermatozoides bovinos	23
1.3.3.1. Análisis de la viabilidad espermática	24
1.3.3.2. Análisis de la funcionalidad mitocondrial	26
1.3.3.3. Análisis de la integridad acrosomal.....	26
2. Criopreservación del semen bovino	28
2.1. Diluyentes utilizados para la congelación del semen bovino	29
2.1.1. pH y capacidad tampón	30
2.1.2. Sustancias orgánicas protectoras de los espermatozoides frente al shock por frío	31

2.1.3. Agentes crioprotectores y efectos de la congelación sobre las células espermáticas	33
2.1.3.1. Eventos que ocurren durante la congelación y descongelación	33
2.1.3.2. Causas de muerte celular por congelación	34
2.1.3.3. Agentes crioprotectores	35
2.1.3.3.1. Cómo actúa el glicerol en las células.....	36
2.1.3.3.2. Efectos nocivos del glicerol.....	37
2.1.3.3.3. Concentración óptima de glicerol.....	37
2.2. Periodo de equilibrado	38
2.3. Formato de envasado	40
2.4. Congelación	40
2.5. Descongelación.....	42
III. OBJETIVOS.....	44
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	46
V. RESULTADOS	58
VI. DISCUSIÓN.....	67
VII. CONCLUSIONES	76
VIII. RESUMEN	79
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
X. ARTÍCULOS	105

I. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la acción crioprotectora del glicerol sobre los espermatozoides (Polge y col., 1949), la inseminación artificial (IA) con semen congelado comenzó a practicarse de forma generalizada en la especie bovina. La evolución tan favorable de esta técnica se ha debido a las pocas desventajas y muchas ventajas que presenta, siendo la mas relevante desde el punto de vista zootécnico, la de permitir de una forma más rápida que la monta natural la difusión de aquellos caracteres genéticos mejorantes de las producciones animales.

El auge experimentado por la IA se debe a los continuos avances conseguidos en la metodología empleada en cada una de las fases que constituyen dicha técnica, lo que ha mejorado los resultados de fertilidad obtenidos. Las investigaciones desarrolladas en este campo han estudiado los sistemas de recolección seminal, los métodos empleados en la dilución y la conservación del semen, la determinación del número óptimo de espermatozoides por dosis y el momento más adecuado para realizar la inseminación. De todas estas investigaciones se han obtenido los distintos procedimientos empleados de forma rutinaria para la IA en la especie bovina.

Un tema que siempre ha preocupado a los investigadores ha sido el desarrollo de pruebas de laboratorio que permitan predecir de forma precisa la capacidad fecundante del semen que posteriormente se va a emplear en la inseminación, o determinar si un protocolo de congelación espermático funciona bien o no. Obviamente, el método más fiable para determinar la capacidad fecundante de un eyaculado es la inseminación de un gran número de vacas (Amann, 1989), sin embargo, la información recibida mediante este sistema es muy tardía, resulta muy costosa, y además puede estar influenciada por multitud de factores dependientes de la hembra y, por tanto, modificar los resultados obtenidos. Por otra parte, no hay muchas dudas de que el análisis objetivo, riguroso y simultáneo, de varios parámetros relativos a las características funcionales y morfológicas de los espermatozoides, permite estimar razonablemente el potencial fecundante de una muestra de semen (Amann, 1989). Por tanto, no es sorprendente que no se hayan escatimado esfuerzos para el desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro*, como la citometría de flujo o los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que permiten el

estudio de múltiples características funcionales y morfológicas de los espermatozoides, para intentar predecir la capacidad fecundante del semen de la forma más objetiva posible. Además, la aplicación de estas nuevas técnicas permite la re-evaluación de muchos aspectos de los protocolos de criopreservación, que hasta ahora se habían evaluado de forma más o menos subjetiva, tales como la elección del mejor diluyente para obtener una mayor supervivencia espermática postdescongelación o la temperatura ideal de descongelación de las dosis seminales.

El uso de los sistemas CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual y ello permite identificar la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Davis y col. 1995; Holt, 1996; Abaigar et al., 1999), lo cual es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que, un eyaculado está constituido por una población heterogénea de espermatozoides. Existen numerosas evidencias de la existencia de subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de varias especies de mamíferos (Holt, 1996; Abaigar y col, 1999; 2001; Rigau y col., 2001; Quintero-Moreno y col., 2003; 2004). La presencia de estas subpoblaciones podría sugerir la existencia de alguna relación entre cambios en la estructura subpoblacional de una muestra de semen y su capacidad fecundante, pero esto todavía no se ha demostrado. En la especie bovina, de momento no se ha investigado la existencia subpoblaciones espermáticas, definidas por sus características cinéticas, en muestras de semen fresco o congelado.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DEL SEMEN BOVINO

1.1. Recogida del Semen

La recogida del semen bovino normalmente se realiza utilizando dos métodos: la vagina artificial o el electroeyaculador. En los centros de inseminación artificial se emplea de forma rutinaria la vagina artificial. Excepcionalmente en casos muy concretos, como pueden ser toros con problemas físicos que no puedan realizar la monta, animales jóvenes o machos mal entrenados que se niegan a saltar, se puede utilizar el electroeyaculador.

La vagina artificial está constituida por un cilindro rígido de dimensiones diferentes en función de la edad del semental. En ambos extremos del cilindro se fija la camisa de caucho que delimita una cámara interior. El espacio interior se rellena de agua a 45°C a través de una válvula, pudiendo insuflarse también aire con el objeto de incrementar la presión y facilitar la eyaculación del semental. En uno de los extremos del cilindro se acopla un embudo de caucho unido a un tubo de vidrio graduado, protegido de la luz y del frío por una funda protectora. El pene en erección se introduce en el interior de la vagina artificial y, gracias a las condiciones de temperatura y presión, se desencadena la eyaculación del macho. Es un método muy eficaz que, realizado apropiadamente, puede utilizarse a lo largo de la vida reproductiva del semental. Si la temperatura o la presión interior de la vagina no son las adecuadas o la recogida la realiza personal no entrenado, se pueden originar lesiones en el pene que pueden llegar a suprimir la libido del toro y el rechazo de la monta. En la recogida del semen se facilitará la extracción si se utiliza un animal entrenado para realizar las funciones de maniquí; suele emplearse un semental que ha terminado su etapa reproductiva y que se encuentra en buena condición corporal. La recogida de semen en toros adultos suele realizarse dos veces a la semana, con un intervalo de 4 días entre los dos días de la monta. En los días de extracción normalmente se realizan dos falsas montas sobre el semental que permanece como maniquí, con el fin de estimular al toro donante y obtener un semen con buena concentración espermática; en la tercera monta, se introduce el pene en la vagina artificial con el fin de provocar la eyaculación. En cada día de recogida se recolectan dos eyaculados con un intervalo de 20

minutos entre cada monta. En animales jóvenes únicamente se hace una extracción semanal, en la que también se recolectan dos eyaculados. (Corteel, 1977; Pickett y Back, 1973; Furman y col., 1975; Salisbury y col., 1978).

1.2. Volumen del Eyaculado y Concentración Espermática

El cálculo del volumen y de la concentración de espermatozoides del eyaculado debe hacerse de forma precisa, ya que de estos dos parámetros va a depender el número de dosis seminales que pueden elaborarse a partir de un eyaculado. El volumen debe calcularse mediante pesada y transformación posterior de este valor mediante el factor de densidad correspondiente (Van Camp, 1997; Howard y Pace, 1998). La comprobación del volumen directamente en un tubo graduado, aunque de uso frecuente, suele inducir a error, bien por la presencia de burbujas de aire que dificultan la observación, o por la inexactitud de la propia escala del tubo.

El método más preciso para evaluar la concentración espermática del eyaculado es el recuento de espermatozoides en un hemocitómetro. Este método, para uso rutinario en centros de inseminación artificial (IA) donde cada día se evalúan un gran número de eyaculados y es necesario agilizar el trabajo, se hace laborioso y lleva tiempo (Boixo, 1996). En estos casos, normalmente se opta por el uso de un espectrofotómetro, que permite estimar de forma indirecta la concentración espermática basándose en la absorción o dispersión de la luz provocada por los espermatozoides en suspensión. La determinación de la concentración espermática mediante un espectrofotómetro es un método rápido y facilita resultados con un margen de error asumible (Catena y Cabodevilla, 1999). El uso del hemocitómetro ha quedado relegado a un segundo plano, empleándose fundamentalmente para obtener la curva de calibración del espectrofotómetro, o en laboratorios en los que se evalúa un número reducido de muestras de semen, o bien cuando este proceso se realiza de forma ocasional (Garner, 1997).

En la producción comercial de semen bovino congelado, el número mínimo de espermatozoides por pajuela necesario para obtener la máxima fertilidad *in vivo* se ha establecido en 15 millones, con al menos el 50% de motilidad progresiva post-descongelación (Van Lieshout, 1995). No obstante, las dosis seminales producidas por

muchos centros de IA exceden este número mínimo establecido, intentando garantizar la presencia de al menos 10 millones de espermatozoides vivos y con motilidad progresiva en cada dosis seminal. Este número mínimo, para algunos sementales excepcionales, probablemente pueda ser reducido hasta 5 ó 6 millones de espermatozoides vivos por dosis sin un descenso significativo en la fertilidad (Januskaukas y col., 1996), pero estos individuos tendrían que ser identificados previamente. A partir de ese mínimo establecido, por mucho que se incremente la concentración espermática de las dosis seminales no se va a reflejar en un aumento de la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 2002).

1.3. Evaluación de la Calidad del Semen

Durante las últimas décadas, la IA ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado tenga una calidad adecuada.

Uno de los objetivos prioritarios de la industria de la IA ha sido la predicción de la capacidad fecundante del semen comercializado; con esta finalidad se han ido desarrollando a lo largo del tiempo diferentes métodos diagnósticos, desde la evaluación de la motilidad, concentración y morfología espermática de los eyaculados hasta la contrastación de dosis de semen congelado mediante sistemas de análisis computerizado, citometría de flujo y tests de funcionalidad espermática basados en la fecundación *in vitro*.

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario. La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de criopreservación.

Los nuevos sistemas computerizados para el análisis de la motilidad y de la morfometría espermática, junto con las tecnologías de fluorescencia, permiten adquirir, de forma rápida y objetiva, datos precisos sobre múltiples parámetros relativos a características estructurales y funcionales de los espermatozoides. Aunque no existe ningún método que por si mismo sea capaz predecir la capacidad fecundante del semen (Rodríguez-Martínez y col., 1997), las modernas técnicas automatizadas son fiables, de fácil ejecución y elevada repetibilidad, por lo que permiten estandarizar y objetivar la contrastación espermática.

1.3.1. Motilidad Espermática

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

1.3.1.1. Aspectos Fisiológicos de la Motilidad Espermática

1.3.1.1.1. Estructura de la cola del espermatozoide

La estructura básica del espermatozoide consta de dos partes claramente diferenciadas: la cabeza, que contiene la información genética y el mecanismo necesario para la penetración del ovocito, y la cola, que representa el medio de locomoción del espermatozoide.

La cola de los espermatozoides de los mamíferos está formada por varios componentes funcionalmente dependientes. Aunque el tamaño y forma de estos

componentes varía de unas especies a otras, su organización estructural es muy similar. La cola del espermatozoide puede dividirse en cuatro porciones anatómicas: el cuello o pieza de unión, la pieza intermedia, la pieza principal, y el segmento o pieza terminal, todas ellas rodeadas por una membrana plasmática común.

El axonema es una estructura común a todas las regiones de la cola, se localiza centralmente, y es el aparato motor del espermatozoide. Está compuesto por un par central de microtúbulos rodeado de nueve pares o dobletes espaciados de modo uniforme. Los nueve dobletes están rodeados por nueve fibras densas externas (Fawcett y Porter, 1954; Linck, 1979; Amelar y col., 1980). En cada doblete, el microtúbulo más interno proyecta dos brazos de dineína hacia el doblete adyacente, en el sentido de las agujas del reloj, uno más externo y otro más interno, así como una hilera de proyecciones radiales dirigidas hacia el par central de microtúbulos. Los nueve pares están conectados entre sí por puentes proteicos de nexina. Rodeando a los dos túbulos centrales hay una vaina o filamento helicoidal formado a partir de las proyecciones radiales (Gibbons y Grimstone, 1960). Entre los dobletes externos y el par central, y entre cada doblete y su correspondiente fibra densa, hay uniones estructurales. La asociación del axonema con las fibras densas constituye el haz de fibras axiales, cuya función es la de otorgar direccionalidad y flexibilidad al movimiento de la cola (Gagnon, 1995).

Las estructuras que rodean al haz de fibras axiales permiten diferenciar las piezas intermedia y principal de la cola del espermatozoide. La pieza intermedia está rodeada por una cubierta mitocondrial compacta, adoptando estos orgánulos una disposición helicoidal. La pieza principal está rodeada por una cubierta fibrosa estriada. Ambas estructuras están separadas por el annulus o anillo de Jensen. La pieza terminal, es la región más distal de la cola y comienza en el punto en que desaparece la cubierta fibrosa. En la parte inicial de esta región, la organización del axonema permanece intacta, pero en la distal, los dobletes de microtúbulos se van disociando gradualmente hasta desaparecer, siendo el par central el último en disociarse.

1.3.1.1.2. Mecanismo que permite la motilidad espermática

Las mitocondrias representan la central energética del espermatozoide, y suministran energía, en forma de ATP, a los brazos de dineína de cada doblete de microtúbulos. Los brazos de dineína, que realmente son moléculas ATP-asa, degradan el ATP liberando la energía que permite el movimiento del flagelo. Cada doblete presenta dos brazos de dineína dirigidos hacia el doblete adyacente, que al ser estimulados por el ATP actúan como “ganchos” y se desplazan a lo largo del doblete adyacente. El resultado es el deslizamiento de un doblete sobre otro. Los radios de unión entre cada doblete y el par central se resisten al deslizamiento, originando la curvatura del flagelo. La correcta secuencia de deslizamiento de los dobletes, provoca que se formen y se propaguen las ondas, y así la cola espermática experimenta su movimiento rotacional y elíptico característico. Esta hipótesis fue sugerida por primera vez por Afzelius (1959) y se conoce como la hipótesis del deslizamiento de microtúbulos.

El movimiento rotacional que experimenta el flagelo se transmite a la cabeza del espermatozoide a través del cuello. Este movimiento rotacional de la cabeza es lo que, en última instancia, otorga progresividad al movimiento espermático (Mortimer, 2000). La motilidad espermática está condicionada por la gestión del metabolismo energético de la célula (Rigau y col, 2001).

1.3.1.1.3. Metabolismo espermático

Los espermatozoides, a diferencia de las células somáticas, carecen de muchos de los orgánulos que participan en los procesos metabólicos. Pero a pesar de ser células muy simples en cuanto a su actividad metabólica, poseen las enzimas necesarias para realizar las reacciones bioquímicas que constituyen la glucólisis. Además, experimentan procesos metabólicos como el ciclo del ácido tricarboxílico, la oxidación de ácidos grasos y el transporte de electrones (Hammerstedt y col., 1988). Para mantener tasas adecuadas de generación de ATP el espermatozoide dispone de dos mecanismos:

-Glucolisis anaerobia: en ausencia de oxígeno los espermatozoides degradan ciertos compuestos que son capaces de atravesar la membrana, como son glucosa, fructosa o manosa, a ácido láctico y ATP.

-Respiración: en presencia de O_2 , los espermatozoides pueden utilizar una variedad de sustratos para generar la energía. La actividad respiratoria permite emplear el lactato o el piruvato resultantes de la glucolisis, produciendo CO_2 y H_2O como productos de desecho (Rodríguez-Gil, 2006). Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente para producir energía que la glucolisis. Por medio de estos procesos catabólicos, los espermatozoides convierten la mayor fracción de la energía en ATP. Aunque una gran parte del ATP se emplea en la motilidad espermática, otra parte se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas del espermatozoide. El empleo de ATP posiblemente está regulado por la concentración endógena de cAMP. Dicha molécula no solo regula la hidrólisis del ATP sino que también tiene un efecto directo sobre la motilidad (Hoskins y Casillas, 1973).

La utilización de cualquiera de las dos vías para la obtención de energía por parte del espermatozoide, va a depender de las condiciones del medio en que se encuentra (pH extracelular, presión de O_2 , composición del medio) así como de la actividad que está desarrollando la célula espermática en el momento que se analiza su estatus metabólico. Cabría pensar que en condiciones de elevado consumo energético la célula espermática tiende a utilizar la ruta oxidativa (ciclo de Krebs) que es más eficiente en términos de producción de ATP que la vía glucolítica (Rodríguez-Gil, 2006).

1.3.1.1.4. Adquisición del movimiento espermático

Los espermatozoides de la mayoría de las especies adquieren la capacidad de movimiento durante su etapa de maduración a lo largo del epidídimo (Yanagimachi, 1981). Una vez que la maduración epididimal se ha completado, los espermatozoides se mantienen en estado quiescente durante algunos días en la cola del epidídimo (Bedford, 1975). Las células epiteliales que revisten el epidídimo del toro, secretan un “factor de quiescencia” (Acott y Carr, 1984) que mantiene al espermatozoide inmóvil. En otras especies como el verraco o la rata, el estado de quiescencia es debido al efecto de una

glucoproteína de elevado peso molecular que se denomina “inmovilina”, la cual determina un incremento de la viscosidad del medio que impide la motilidad espermática (Turner y Giles, 1982).

Si se analizan diferentes regiones anatómicas del epidídimo se observa que, en contacto con una solución tamponada con activadores de la motilidad, los espermatozoides de la cabeza, en la mayoría de los mamíferos, presentan un batido vibratorio que origina movimientos circulares (Blandau y Rumery, 1964; Gaddum 1968; Fray y col., 1972; Burgos y Tovar, 1974). En contraste, los espermatozoides de la cola del epidídimo tienen un movimiento vigoroso que determina una progresión rápida, presentando el flagelo una mayor rigidez y un menor arco de curvatura del batido (Bedford, 1975). La adquisición de la motilidad progresiva depende de un incremento en el contenido intracelular de cAMP, inducido por la exposición a las secreciones epididimales. En espermatozoides maduros procedentes de la cola del epidídimo, la concentración intracelular de cAMP es un 40% superior a la de espermatozoides de la cabeza (Hoskins y col., 1974; Amman y col., 1982).

El principal sitio de almacenamiento de los espermatozoides dentro del aparato reproductor del toro es precisamente la cola del epidídimo, que contiene el 70% de la cantidad total de gametos presentes en los conductos excretores, mientras que el conducto deferente contiene sólo un 2% (Curtis, 1981). La mayor parte de los espermatozoides almacenados y no eyaculados se eliminan gradualmente por excreción en la orina. Aquellos que no se eliminan en la orina experimentan un envejecimiento gradual, primero pierden su capacidad fecundante, luego su motilidad, y por último, degeneran y mueren.

1.3.1.2. Evaluación Subjetiva de la Motilidad Espermática

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación visual de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37°C. En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la motilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se

observa movimiento en ondas. Tras la dilución del eyaculado fresco, o tras la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivos o no progresivos). Las dosis descongeladas con una motilidad progresiva inferior al 40% normalmente se descartan para su uso en IA (NAAB, 1986).

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000; Phillips y col., 2004), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford y col., 1976). La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen (Liu y Foote, 1998), es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse, de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, aunque significativa, sea baja (Kjaestad y col., 1993).

1.3.1.3. Evaluación de la Motilidad Espermática mediante el uso de Sistemas CASA

Desde hace varias décadas numerosos investigadores (Glover, 1968; Katz y Dott, 1975; Amann y Hammerstedt, 1980; Katz y Overstreet, 1981; O'Connor y col., 1981) han dedicado mucho trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas computerizados para el análisis de la motilidad espermática. Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se fue haciendo más asequible. En consecuencia, comenzaron a utilizarse cada vez con más frecuencia en veterinaria, especialmente en la especie bovina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria, en los centros de IA.

Un sistema CASA consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo.

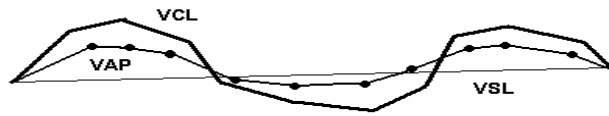
Aunque los principios básicos utilizados para el análisis de las imágenes digitalizadas son similares en los diferentes sistemas CASA que existen en el mercado, hay diferencias apreciables en sus sistemas ópticos, técnicas de captura de imagen y reconocimiento espermático, algoritmos utilizados para la reconstrucción de trayectorias y determinación de las medidas cinéticas, y también en el manejo y análisis de los datos, y consecuentemente, en los resultados finales. (Davis y Katz, 1993; Davis y Siemers, 1995; Irving, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen y col., 2002).

1.3.1.3.1. Definición de los parámetros cinéticos medidos por el CASA

Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los sistemas CASA (Boyers y col., 1989; Farell y col., 1995). Algunos de los parámetros más utilizados por los diversos autores son los siguientes:

- Porcentajes de motilidad total o de motilidad progresiva: en función de su velocidad curvilínea (VCL) o de su velocidad media (VAP), los espermatozoides son clasificados en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos; y dentro de los móviles, en rápidos, medios y lentos.

- Parámetros que definen la velocidad de los espermatozoides (Mortimer, 1997):



-VCL (Velocidad Curvilínea): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.

-VSL (Velocidad rectilínea): distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.

-VAP (Velocidad Media): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.

-LIN (Índice de Linealidad): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Curvilínea.

$$\text{LIN: } (\text{VSL} / \text{VCL}) \times 100$$

-STR (Índice de Rectitud): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Lineal.

$$\text{STR: } (\text{VSL} / \text{VAP}) \times 100$$

-WOB (Índice de Oscilación): es la relación porcentual entre la Velocidad Lineal y la Velocidad Rectilínea.

$$\text{WOB: } (\text{VAP} / \text{VCL}) \times 100$$

Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

-ALH (Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza): es el desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.

-BCF (Frecuencia de batido): es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener

información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar y col., 1991).

1.3.1.3.2. Identificación de subpoblaciones espermáticas

El CASA permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Davis y col., 1995; Holt, 1996; Abaigar y col., 1999). En los últimos años se ha demostrado la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento en los eyaculados de todas las especies estudiadas hasta la fecha, como por ejemplo, el cerdo, el mono tití, la gacela, el caballo o el perro (Holt, 1996; Abaigar y col., 1999; 2001; Quintero-Moreno y col., 2003; Nuñez-Martínez y col., 2006). Además, se ha observado que espermatozoides pertenecientes a distintas subpoblaciones responden de forma diferente ante procesos como la criopreservación o la exposición al efecto de agentes capacitantes (Holt, 1996; Abaigar y col., 1999). En semen bovino fresco o congelado, de momento, no se ha publicado ningún estudio relativo a la identificación de subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento.

Los espermatozoides que forman parte de un eyaculado no son uniformes en cuanto a sus características de motilidad, es decir, en el mismo eyaculado existe un porcentaje de espermatozoides que se mueven de forma rápida y progresiva, otro porcentaje de espermatozoides que se mueven más lentamente, y por último, aparece un número de espermatozoides sin apenas movimiento. Por lo tanto, si no consideramos la existencia de estas subpoblaciones en un eyaculado, tal y como se hacía hasta hace pocos años, y partimos de la base de que el eyaculado es una población homogénea, se estará perdiendo información relevante. Probablemente, la capacidad fecundante de un eyaculado o de una dosis de semen descongelado resida únicamente en la subpoblación que contiene a los espermatozoides más competentes. Si esta subpoblación representa un porcentaje muy pequeño, sus características se verán enmascaradas por el resto de la población. Esto explicaría, al menos en parte, que no se haya observado correlación significativa entre parámetros cinéticos medios (por ejemplo VCL, VSL, LIN o ALH) y la fertilidad *in vivo* de una dosis seminal (Holt y Van Look, 2004).

Además de un estudio minucioso de la motilidad, los sistemas computerizados, también permiten realizar medidas de las dimensiones de la cabeza espermática. Se conocen como sistemas ASMA (Assisted Sperm Morphology Analysis), y están diseñados para realizar medidas del área, perímetro, longitud y anchura de las cabezas espermáticas presentes en una extensión de semen fijada y teñida. Es interesante disponer de los datos morfométricos de las dosis seminales, puesto que se ha comprobado que la morfometría anormal de las cabezas espermáticas influye negativamente en la fertilidad de los sementales bovinos (Gravance y col., 1996).

1.3.1.3.3. Algunos inconvenientes de los sistemas CASA

El uso de sistemas CASA para la contrastación rutinaria de las dosis seminales ofrece notables ventajas pero también posee algunos inconvenientes. Uno de los principales es que no existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos empleados en los análisis (Verstegen y col., 2002). Los diferentes laboratorios trabajan con distintos equipos, y las características técnicas difieren de unos a otros, lo cual provoca que los resultados facilitados por los distintos centros para los mismos parámetros sean muy dispares. Existen una serie de consideraciones prácticas y biológicas que afectan a los resultados obtenidos con el CASA. Según Verstegen y col. (2002) entre los principales factores de los que depende el resultado final están:

- La temperatura de análisis del semen.
- El volumen analizado.
- El tipo de cámara utilizada.
- El tiempo que transcurre entre la recogida y el análisis.
- La concentración espermática de la muestra.
- El diluyente utilizado.
- El objetivo del microscopio utilizado en el análisis, así como la iluminación, etc.

Esto significa que cada laboratorio debe estandarizar su propio equipo y establecer su propio protocolo de trabajo, teniendo en cuenta que dichos resultados serán únicamente aplicables a las muestras evaluadas con ese equipo en cuestión.

Los sistemas CASA permiten determinar la concentración espermática de la muestra a analizar. Sin embargo, Verstegen y col. (2002) comprobaron, utilizando muestras de semen de distintas especies animales, que los CASA tienden a sobreestimar la concentración de espermatozoides de la muestra. Dichos autores atribuyen el error a que, debido a las colisiones espermáticas, el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución del semen, los problemas de sobreestimación de la concentración tienden a disminuir puesto que la posibilidad de colisión disminuye.

1.3.2. Morfología Espermática

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra, impidiendo la unión con el ovocito (Rodríguez-Martínez, 1999). A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, descende la capacidad fecundante del mismo (Howard y Pace, 1998). Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% (Barth y Oko, 1989) han de descartarse para la congelación.

Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores) (Bloom, 1977; Barth y Oko, 1989); b) de si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente) (Milovanov, 1938; Bloom, 1977); o c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen. Por ejemplo, si una

dosis seminal tiene una motilidad espermática entorno al 50%, y contiene un 30% de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales, la alta incidencia de esta morfoanomalía repercutirá negativamente en la fertilidad de esa muestra pese a la buena motilidad del eyaculado. Este defecto es muy común en sementales jóvenes y normalmente su incidencia va disminuyendo a medida que el toro crece y maduran sus órganos sexuales (Amann y col., 2000). Otra anomalía relativamente frecuente son los espermatozoides con la cabeza de forma piriforme. Los espermatozoides con este defecto se observó que presentaban menor capacidad de unión y de penetración de la zona pelúcida, y si conseguían fecundar a algún ovocito, los cigotos resultantes tenían menor capacidad para iniciar su desarrollo y degeneraban a las pocas horas (Thundathil y col., 1999).

Un grupo de anomalías de especial importancia son las que afectan al acrosoma, y entre las más frecuentes se han descrito el acrosoma nudoso y la membrana acrosomal aplanada. Los espermatozoides con acrosoma nudoso se encontraron en el eyaculado de sementales frisonos cuya espermatogénesis estaba alterada y se cree que es un defecto de origen congénito y hereditario (Barth y Oko, 1989). Los eyaculados que contienen espermatozoides con el acrosoma nudoso suelen presentar también otras anomalías espermáticas, lo que compromete aun más la fertilidad del semental (Gran y Dott, 1976). Si el porcentaje de espermatozoides con acrosoma nudoso es elevado, se podría decir que el semental es virtualmente estéril, puesto que los espermatozoides con esta alteración se comprobó que no eran capaces de atravesar la zona pelúcida (Thundathil y col., 2000; 2002). Además, se cree que es un defecto no compensable, es decir, los espermatozoides normales presentes en el mismo eyaculado también tenían menor capacidad fecundante.

Otra anomalía acrosómica es la membrana acrosomal aplanada, que se describió por primera vez en eyaculados de toros frisonos. Se observó que los espermatozoides procedentes de eyaculados bovinos con alta incidencia de esta anomalía podían unirse normalmente a la zona pelúcida del ovocito, y su matriz acrosomal permanecía funcional (Thundathil y col., 2001; Meyer y Barth, 2001). No obstante, no se investigó si los embriones eran viables o por el contrario degeneraban a los pocos días.

Las anomalías que afectan al núcleo espermático, como las vacuolas nucleares, suelen tener una menor incidencia. Thundathil y col. (1998) demostraron que los

espermatozoides que presentaban este defecto nuclear se unían con dificultad a la zona pelúcida pero eran capaces de penetrar el citoplasma del ovocito y fertilizarlo, y el embrión formado continuaba su desarrollo hasta la fase de blastocisto.

Otras anomalías más frecuentes en semen bovino, como las colas enrolladas o los plegamientos de la pieza intermedia, si son abundantes en el eyaculado, pueden comprometer la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal y por tanto no van poder alcanzar las proximidades del ovocito (Nothling y Arndt, 1995).

Siempre que aparezcan anomalías en un eyaculado la fertilidad del semental puede verse comprometida, pero realmente no se sabe cuál es el porcentaje máximo de morfoanomalías espermáticas que puede ser compatible con una fertilidad normal. Lo que está demostrado es que existe una correlación negativa entre el número de formas anormales y la fertilidad del semental (Barth y Oko, 1989; Januskauskas y Žilinskas, 2002).

1.3.3. Citometría de Flujo: Métodos Aplicados al Análisis de Espermatozoides Bovinos

La citometría de flujo es una técnica que permite identificar, cuantificar y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión, en función de los distintos patrones de tinción adquiridos tras el marcaje con diferentes colorantes fluorescentes, que se unen a estructuras celulares específicas o se acumulan selectivamente en compartimentos intracelulares.

A lo largo de las dos últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la investigación de poblaciones espermáticas. Se han desarrollado muchos métodos de tinción y combinaciones de fluorocromos, se han comercializado muchos fluorógenos nuevos, que permiten analizar una gran variedad de funciones espermáticas, y como resultado, hoy en día, el uso de esta técnica ofrece la posibilidad de analizar múltiples características espermáticas, simultáneamente en la misma muestra de semen, de una forma rápida, precisa y objetiva. Debido al creciente

número de parámetros analizables y al desarrollo de citómetros a un coste accesible, se ha extendido su uso tanto en laboratorios de investigación como en centros de IA.

Entre las características espermáticas más frecuentemente analizadas para el control de calidad del semen bovino se incluyen el estudio de la viabilidad espermática, de la integridad acrosomal y de la funcionalidad mitocondrial, así como la investigación del estado de capacitación de los espermatozoides. Además, la citometría de flujo también permite obtener muestras de espermatozoides sexados, bien para su uso en IA o en fecundación *in vitro* (Garner y col., 1983; Pinkel y col., 1985; Johnson y col., 1989).

1.3.3.1. Análisis de la viabilidad espermática

El estudio de la viabilidad espermática normalmente se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables (Garner y col., 1997).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el Ioduro de propidio (PI). Este compuesto entra en espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del PI, existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar, como por ejemplo, el Hoechst 33258 (Keeler y col., 1983; Pintado y col., 2000), el bromuro de etidio (Evenson y col., 1982) o la hidroetidina (HED) (Ericsson y col., 1989), entre otros.

Entre los fluorocromos más utilizados para identificar la población de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluoresceínas: CFDA: diacetato de carboxifluoresceína, (Garner y col., 1988; Harrison y Vickers, 1990), CMFDA: diacetato de carboximetilfluoresceína, (Garner y col., 1986) o CDMFDA: diacetato de carboxidimetilfluoresceína (Ericsson y col., 1990), que son compuestos no fluorescentes capaces de atravesar membranas celulares intactas. En el interior de las células, debido a la

acción de esterasas intracelulares, se convierten en carboxifluoresceína, molécula que al ser excitada a una longitud de onda de 488 nm emite fluorescencia verde, quedando retenida intracelularmente por membranas celulares intactas.

Otro fluorocromo ampliamente utilizado para identificar espermatozoides vivos es el SYBR-14, que es capaz de atravesar membranas intactas y de unirse al ADN de los espermatozoides (Garner y col., 1988; Garner y Johnson, 1995). Presenta algunas ventajas con respecto a los fluorocromos basados en la actividad esterasa intracelular: es una molécula más estable, no tiene que sufrir una transformación enzimática para poder actuar, y se une específicamente al ADN del espermatozoide, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material genético no se va a marcar, y por tanto quedará descartada del análisis. El SYBR-14 suele utilizarse en combinación con PI (Garner y col., 1988), y de esta forma se pueden distinguir dos poblaciones espermáticas: una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al PI, y por tanto emiten fluorescencia roja; y la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al PI pero dejan entrar el SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde.

Un fluorocromo con un mecanismo de acción similar al del SYBR-14, capaz de identificar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este compuesto también entra en células vivas y se une al ADN espermático, sin embargo, su uso está limitado por la longitud de onda de su espectro de excitación, que está en el rango UV. La mayoría de los citómetros disponen de un láser con una longitud de onda de 488 nm, y para evaluar las muestras marcadas con Hoechst 33342, es preciso disponer de un láser de menor longitud de onda.

Con respecto a la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales hay discrepancia entre los autores. Decuadro y col. (2002) y Christensen y col. (2004) hablan de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis, siempre que se respete una concentración espermática mínima por pajuela. Sin embargo, Graham (2001) observó que la viabilidad espermática apenas se correlacionaba con la fertilidad. Los marcadores para viabilidad espermática pueden usarse en combinación con otros fluorocromos que

permiten valorar otras estructuras del espermatozoide, como la integridad de la membrana acrosomal o la funcionalidad mitocondrial.

1.3.3.2. Análisis de la funcionalidad mitocondrial

El fluorocromo Rodamina 123 fue el primero que se utilizó para evaluar la funcionalidad mitocondrial en espermatozoides humanos, y posteriormente en los de otras especies domésticas (Evenson y col., 1982; Anger y col., 1989; Graham y col., 1990). Este fluorocromo penetra en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior. Al incidir la luz del láser sobre espermatozoides teñidos con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia verde (Ericsson y col., 1993). La Rodamina 123 suele utilizarse en combinación con PI, que tiñe de rojo el núcleo de los espermatozoides degenerados y por tanto sin actividad mitocondrial. Aunque la Rodamina 123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células (Graham, 2001). Evaluando dosis de semen bovino congelado, Gillan y col. (2005) observaron una elevada correlación entre el porcentaje de espermatozoides positivos a Rodamina 123 y el porcentaje de espermatozoides positivos a SYBR-14, lo que indica que los espermatozoides vivos en la mayor parte de los casos tienen funcionalidad mitocondrial.

Thomas y col. (1998) y Garner y Cheryl (1999) desarrollaron una nueva tinción mitocondrial utilizando el fluorocromo JC-1, que permite diferenciar entre espermatozoides con baja y alta actividad respiratoria. El JC-1 se acumula en el interior de las mitocondrias, si la actividad respiratoria es elevada forma agregados intramitocondriales que emiten fluorescencia naranja, y si la actividad respiratoria es baja, el JC-1 no llega a formar agregados y emite fluorescencia verde.

1.3.3.3. Análisis de la integridad acrosomal

La integridad acrosomal puede ser valorada por numerosos procedimientos (Cross y Meizel, 1989), pero cuando se utiliza citometría de flujo como método de análisis, el más común es el uso de una lectina conjugada con un fluorocromo (Graham y col., 1990; Cheryl y col., 1997; Maxwell y col., 1997). Entre todas las lectinas disponibles comercialmente, las más frecuentemente utilizadas son la PNA (*peanut agglutinin*), que se une específicamente a la membrana acrosomal interna de los espermatozoides (Cross y Watson, 1994), y la PSA (*pisum sativum agglutinin*), que se une a la matriz acrosomal y a la membrana acrosomal externa (Cross y col., 1986; Way y col., 1995). El uso de lectinas conjugadas con un fluorocromo, como por ejemplo fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), permite detectar aquellos espermatozoides que tienen la membrana acrosomal dañada, lo cual posibilita el paso de la lectina, y por tanto del fluorógeno, al interior del compartimento acrosomal (Graham y col., 1990; Nolan y col., 1992).

Cross y col., (1986) y otros (Centola y col., 1990; Mendoza y col., 1992) describieron el uso de PSA marcada con FITC para detectar acrosomas intactos en lugar de acrosomas dañados, en espermatozoides humanos, utilizando microscopía de fluorescencia. En estos estudios, los espermatozoides tenían que ser fijados y sus membranas permeabilizadas con etanol para permitir el acceso de la lectina al contenido acrosomal. Este método se adaptó con éxito al estudio de espermatozoides de diversas especies domésticas (Berger, 1990; Mattioli y col., 1996; Sukardi y col., 1997). Sin embargo, el tratamiento de los espermatozoides con etanol no es recomendable cuando se va a utilizar citometría de flujo para el análisis de las muestras, puesto que puede causar precipitación de sales presentes en el medio extracelular y aglutinación celular (Crissman y Steinkamp, 1990), y además, dificulta el análisis simultáneo de la viabilidad espermática y de la integridad acrosomal. Por tanto, este método se utiliza más frecuentemente en combinación con microscopía de fluorescencia, mientras que con citometría de flujo, lo más común es el uso de espermatozoides vivos no permeabilizados, y por tanto la lectina detectará los acrosomas dañados.

Otra posibilidad para identificar la presencia de alteraciones acrosomales es el uso de anticuerpos monoclonales, marcados con un fluorocromo, frente a moléculas específicas del contenido acrosomal (Palencia y col., 1996; Thomas y col., 1996).

Para valorar simultáneamente el estado del acrosoma y la viabilidad espermática se pueden combinar tres fluorocromos. Por ejemplo, Nagy y col. (2003) desarrollaron una triple tinción para espermatozoides bovinos, en la que combinaban el uso de SYBR-14 y PI, para evaluar la viabilidad espermática, con la lectina PNA marcada con ficoeritrina (PE-PNA), que tiñe en naranja los acrosomas dañados. Esta triple tinción genera la aparición de cuatro poblaciones espermáticas: 1) espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (positivos a SYBR-14 y negativos a PE-PNA), 2) espermatozoides vivos con el acrosoma dañado (positivos a SYBR-14 y positivos a PE-PNA), 3) espermatozoides muertos con el acrosoma intacto (positivos a PI y negativos a PE-PNA) y 4) espermatozoides muertos con el acrosoma dañado (positivos a PI y a PE-PNA). Durante las primeras horas tras la descongelación de las muestras, los espermatozoides vivos apenas tienen el acrosoma dañado, es decir, la segunda población espermática está ausente, sin embargo, esta población puede aparecer tras varias horas de incubación a 37°C. Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la integridad acrosomal y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Thomas y col., 1996).

2. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO

La conservación del semen en nitrógeno líquido tiene como objetivo fundamental prolongar la viabilidad de los gametos masculinos de forma indefinida, ya que a temperatura ambiente o de refrigeración los espermatozoides degeneran con cierta rapidez, debido principalmente al agotamiento de las reservas energéticas. La inseminación artificial con semen congelado ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras su descongelación. Para conseguir dicho objetivo, en todo protocolo de congelación seminal han de controlarse rigurosamente los sucesivos pasos que constituyen el proceso de criopreservación, y de forma especial aquellos que influyen más directamente sobre la estructura y función de las membranas espermáticas, y sobre el metabolismo celular (Hammerstedt y col., 1990).

Cualquier protocolo de congelación seminal incluye cinco pasos principales:

- 1.- dilución y adición del crioprotector.
- 2.- enfriamiento y envasado.
- 3.- congelación
- 4.- almacenamiento
- 5.- descongelación

2.1. Diluyentes Utilizados para la Congelación del Semen Bovino

Un diluyente seminal debe reunir una serie de propiedades básicas relacionadas con su pH, capacidad tampón, osmolaridad, y fuerza iónica. Además debe aportar una fuente de energía, no debe deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso, debe proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación, y finalmente, debe ser resistente al crecimiento bacteriano (Melrose, 1962; Mann, 1964). Ningún diluyente cumple todos estos requisitos, y además, cada especie requiere unas condiciones específicas (Watson, 1979). No obstante, los diluyentes utilizados para la congelación del semen de la mayoría de las especies domésticas, invariablemente incluyen los siguientes ingredientes:

1. agua bidestilada o ultrapura, como disolvente para el resto de los componentes.
2. sustancias iónicas y no iónicas para mantener la osmolaridad y amortiguar el pH del medio.
3. materiales orgánicos, generalmente yema de huevo o leche, con capacidad para prevenir o atenuar el shock por frío
4. agentes crioprotectores, normalmente el glicerol
5. azúcares simples como fuente de energía, o di- y trisacáridos como crioprotectores adicionales.
6. antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano (Salisbury y col., 1978).
7. y opcionalmente, otros aditivos, como enzimas, detergentes o aminoácidos que puedan mejorar la fertilidad

2.1.1. pH y Capacidad Tampón

Según los primeros trabajos realizados, el pH óptimo de un diluyente depende de la naturaleza del mismo y de los iones que contiene (Salisbury y col., 1978), y además puede variar a lo largo de los distintos pasos del proceso de criopreservación. No obstante, en la mayor parte de los diluyentes utilizados para la congelación del semen bovino, el pH normalmente se sitúa en torno a 7. Para mantener estas condiciones de neutralidad es necesaria la presencia de soluciones tampón, y estas soluciones han de reunir una serie de propiedades: tener un pK entre 6 y 8, preferiblemente 7, máxima solubilidad en agua, han de atravesar selectivamente la membrana plasmática, reducir el efecto de la concentración de sales, tener propiedades quelantes, ser estables y resistir la degradación enzimática (Graham, 1978). Se han utilizado numerosas soluciones tamponadas para la congelación del semen bovino, siendo en su mayoría combinaciones de yema de huevo con tampón fosfato o citrato sódico y ajustando el pH a 6, 9 por adición de ácido cítrico (Watson, 1979). Melrose (1962) indicó que no era necesaria la adición de ácido cítrico, ya que la yema de huevo tiene suficiente capacidad amortiguadora para retornar el pH a la neutralidad. También se han utilizado diluyentes elaborados con leche entera homogeneizada y leche desnatada, bien fresca o deshidratada, y parecen tener una adecuada capacidad tampón, probablemente debido a las proteínas presentes en la leche (Jones, 1969a).

Foote (1972) comenzó a incorporar el Tris (tris hidroximetil aminometano) a los medios diluyoconservadores utilizados para el semen de toro, puesto que observó que dicha sustancia tampón combinada con yema de huevo y glicerol favorecía el mantenimiento de los espermatozoides tanto a 5°C como a -85°C. Cuando se incluye el Tris como única sustancia tampón, es necesario añadir otras sales y azúcares para mantener la osmolaridad (Lapwood y Martin 1972).

Si bien se han utilizado otros tampones orgánicos como el HEPES [N-2 (hidroxietil) piperazina-N-2-etano ácido sulfónico], TES [N-TRIS (hidroximetil-2-aminoetano ácido

sulfónico)], BES [N,N BIS (2 hidroxietil)-2 aminoetano ácido sulfónico], pero los estudios realizados en semen de toro son escasos (Pace y Graham., 1970; Foote, 1972; Graham, Crabo y Brown, 1972). Hoy en día, la mayor parte de los diluyentes utilizados para la congelación del semen bovino incluyen Tris y ácido cítrico como principales sustancias tampón.

2.1.2 Sustancias Orgánicas Protectoras de los Espermatozoides frente al Shock por Frío

Desde que Phillips (1939) descubrió que la yema de huevo era un valioso aditivo para el mantenimiento de la capacidad fecundante de los espermatozoides, esta sustancia se incluyó como constituyente de muchos diluyentes. La yema de huevo se demostró que ejercía un efecto protector sobre las membranas plasmáticas, acrosomal y mitocondrial de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas (Jones y Martín, 1973) además de preservar la motilidad espermática durante la refrigeración del semen (Lardy y Phillips, 1939).

También se han desarrollado diluyentes en base al uso de leche desnatada en polvo o leche entera homogeneizada, pudiendo ser el constituyente básico del diluyente (Thacker y Alquist, 1951), o bien ser incorporadas en pequeñas cantidades a un diluyente sintético (Jones, 1968, 1969 b). En el caso de la leche, se sabe que el agente responsable del efecto protector de las membranas espermáticas reside en la caseína, cuya concentración óptima oscila entre el 1 y el 8%. Sin embargo, a un nivel molecular, todavía no está clara la naturaleza de este efecto protector (Salisbury y col., 1978).

En cuanto a los componentes de la yema de huevo con actividad crioprotectora, se han propuesto los fosfolípidos y las proteínas (Kampschmidt y col, 1953; Bialy y col., 1957; Martin, 1963; Lanz y col., 1965; Gebauer y col., 1970), y se ha llegado a la conclusión de que la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDF) es la principal responsable del efecto crioprotector (Pace y Gram., 1974; Watson y Martin, 1973, 1975; Watson, 1976; Foulkes, 1977). Todavía no se han aclarado los mecanismos por los cuales las LDF protegen a los espermatozoides de los daños ocasionados por la congelación (Voglmayr y col., 1983). Foulkes (1977) sugirió que la yema de huevo preserva la

integridad de la membrana plasmática previniendo la pérdida de hialuronidasa soluble. Watson (1975 b) propuso que los espermatozoides son protegidos por un recubrimiento reversible y sugirió que las proteínas de la fracción lipoproteica se unen a la superficie de la membrana evitando la pérdida de fosfolípidos de membrana durante la criopreservación.

Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de acción de las LDF sobre las membranas espermáticas. Manjunath y col., (2002) demostraron que las LDF de la yema de huevo tienen una elevada afinidad para unirse a las proteínas del plasma seminal bovino; esta unión se produce de forma rápida, específica, saturable y estable, y se mantiene después de la congelación. Las proteínas del plasma seminal bovino, durante la eyaculación, se unen a las membranas espermáticas recubriéndolas superficialmente (Manjunath y col., 1994) e inducen la salida de fosfolípidos y colesterol de membrana provocando su destabilización, y este efecto es tiempo- y concentración-dependiente (Thérien y col. 1998, 1999). Cuanto más prolongada sea la exposición a las proteínas del plasma seminal, mayor cantidad de colesterol y de fosfolípidos serán eliminados de la membrana plasmática. La pérdida de lípidos, especialmente de colesterol, induce la desestabilización de las membranas y causa una reducción de su resistencia al shock por frío y a la congelación (Darin-Bennet and White 1977; White 1993). Se ha sugerido (Manjunath y col., 2002) que las lipoproteínas de la yema de huevo protegen a los espermatozoides durante el enfriamiento y la congelación, debido a que se unen a las proteínas del plasma seminal presentes en el semen, secuestrándolas en su mayoría y por tanto, impidiendo su efecto negativo sobre las membranas espermáticas.

Tanto la yema de huevo como las proteínas de la leche representan un riesgo higiénico por tratarse de productos de origen animal, y por tanto, su uso podría asociarse a la introducción de contaminación microbiana en las muestras de semen, con la consiguiente producción de endotoxinas capaces de dañar la capacidad fecundante de los espermatozoides (Bousseau y col., 1998). Además, la presencia de hormonas esteroides en la yema de huevo, se ha sugerido que puede reducir la capacidad fecundante de los espermatozoides. Por otra parte, la yema de huevo y la leche contienen partículas groseras que interfieren en la valoración de la calidad espermática.

Por todas estas razones, a lo largo de la última década se han ido desarrollando nuevos diluyentes basados en el uso de lipoproteínas y lipopolisacáridos de origen vegetal, principalmente a partir de extractos de soja. La eficacia de estos nuevos diluyentes para la congelación del semen bovino ha sido evaluada por diferentes grupos, en comparación con el uso de diluyentes convencionales elaborados con yema de huevo (Bousseau and Brillard 1994; Hinsch y col., 1997a; Müller-Schlösser y col., 2001), pero los resultados obtenidos por los diferentes autores fueron muy dispares, no pudiéndose extraer una conclusión clara. Por ejemplo, Hinsch y col., (1997 a,b) y Gil y col., (2000) no encontraron diferencias significativas en la motilidad espermática o en la integridad acrosómica post-descongelación al comparar diluyentes elaborados a partir de yema de huevo y de soja. Sin embargo, otros autores observaron un descenso en la tasa de no retorno a los 56 días (Van Wagendonk-de Leeuw y col., 2000), una reducción en la motilidad, viabilidad y resistencia osmótica de los espermatozoides (Thun y col., 2005) o una caída brusca en la supervivencia espermática post-descongelación (Christensen y col., 2005), cuando los espermatozoides bovinos se congelaron en diluyentes elaborados a partir de extractos soja frente a los que contenían yema de huevo.

2.1.3. Agentes Crioprotectores y Efectos de la Congelación sobre las Células Espermáticas

2.1.3.1. Eventos que ocurren durante la Congelación y Descongelación

En el proceso de criopreservación espermática, cuando la temperatura desciende por debajo del punto de congelación del medio extracelular, comienza la formación de hielo. El agua pura cristaliza dejando a los solutos en mayor concentración en el agua que permanece en estado líquido. Las membranas celulares impiden la extensión de los cristales de hielo hacia el interior de la célula y por lo tanto el contenido intracelular se encuentra superenfriado, permaneciendo líquido por debajo del punto de congelación, con lo cuál se establece una diferencia en el potencial químico del agua intra y extracelular, creándose una tendencia a que el agua salga de la célula a favor del gradiente osmótico.

A partir de este momento pueden ocurrir dos cosas: si la velocidad de enfriamiento es lo suficientemente lenta, el agua sale de la célula y ésta se deshidrata progresivamente. Pero si la velocidad de enfriamiento es demasiado alta, el agua no puede moverse de la célula lo suficientemente rápido y hay un incremento en el grado de superenfriamiento hasta que ocurre la congelación intracelular para restaurar el equilibrio.

Mazur y col. (1970) demostraron que para todos los tipos celulares estudiados, las curvas de supervivencia *versus* tasa de enfriamiento tienen forma de U o V invertida.

La velocidad de enfriamiento óptima varía considerablemente entre tipos celulares desde menos de 1°C/min para embriones, hasta 2000-3000°C/min para glóbulos rojos. El óptimo puede ser alterado por la presencia de agentes crioprotectores, y además, la mayoría de los tipos celulares no sobreviven a la congelación en ausencia de algún crioprotector. Para las células espermáticas, la tasa óptima de enfriamiento oscila entre 10-100°C/min. Velocidades más rápidas o más lentas resultarán en menor supervivencia (Bruemmer y col., 1963; Salamon, 1970; Colas, 1975; Rodríguez y col., 1975; Robbins y col., 1976; Fiser y Fairfull, 1984).

2.1.3.2. Causas de Muerte Celular por Congelación

A velocidades de enfriamiento superiores a la óptima, la formación de cristales de hielo intracelulares es el factor letal (Mazur, 1977), mientras que a velocidades más bajas que la óptima, los “efectos solución” son los responsables de la pérdida de viabilidad. No hay discusión en cuanto a la idea de que la muerte celular está asociada con la presencia de gran cantidad de cristales de hielo intracelulares, pero algunos estudios han demostrado que pequeñas cantidades de hielo intracelular, no necesariamente son incompatibles con la supervivencia (Sherman, 1962). Además Farrant y col. (1977) demostraron que la cantidad de hielo intracelular y el tamaño de los cristales son lo que determina la supervivencia. Las células congeladas rápidamente (conteniendo cristales de hielo intracelulares), sobrevivirán sólo si son descongeladas rápidamente. El recalentamiento lento da tiempo para la recrystalización, proceso de crecimiento de los cristales durante la descongelación, que es perjudicial.

El término "efectos solución" incluye una serie de hechos interrelacionados: creciente concentración de solutos intracelulares, disminución del contenido de agua intracelular, precipitación de solutos a medida que sus solubilidades son sobrepasadas, resultando en alteraciones del pH (Van Den Berg y Rose, 1959; Van Den Berg y Soliman, 1969), y precipitación de todos los solutos por debajo del punto eutéctico del sistema. Si alguno de estos factores tiene un efecto especialmente perjudicial, es un tema todavía en discusión.

2.1.3.3. Agentes Crioprotectores

En presencia de un crioprotector, la cantidad de agua que permanece en estado líquido a medida que desciende la temperatura es mayor, y por lo tanto, la concentración de electrolitos aumenta menos. El efecto está relacionado con la concentración molar del crioprotector. Mazur y Rigopoulos (1983), y Mazur y Cole (1985), propusieron que la fracción de agua no congelada es más importante que la concentración de electrolitos, ya que la constricción de los canales líquidos causa un estrés físico sobre las células ya contraídas, e incrementa el contacto célula-célula que se considera perjudicial.

Existen numerosos compuestos que ejercen efecto crioprotector sobre las células (Doebbler, 1966; Meryman, 1971), y tradicionalmente se han clasificado en agentes penetrantes o no penetrantes en función de que su acción sea intra o extracelular.

Desde que Polge, Smith y Parkes (1949) demostraron la eficacia del glicerol, se ha considerado como el crioprotector celular universal, y ha sido el más extensamente utilizado para los espermatozoides de la mayoría de las especies de mamíferos, puesto que ningún otro crioprotector ha dado mejores resultados que el glicerol.

Entre los agentes penetrantes, además del glicerol, podemos citar el dimetilsulfóxido (DMSO), el metanol y algunos polialcoholes (Polge y Soltys, 1960; Jones, 1965; Nagase, 1968; Nagase y Tomizuka, 1968; Salamon, 1968; Wilmut y Polge, 1977). El mecanismo de crioprotección de los agentes penetrantes, aunque no totalmente dilucidado, parece ser que es en virtud de sus propiedades coligativas y ligantes de agua (Mazur y col., 1970; Meryman, 1971), disminuyendo el punto crioscópico intracelular, y por lo tanto disminuyendo la concentración de solutos intracelular a una temperatura dada, ya que la

cantidad de agua que permanece en estado líquido será mayor que en ausencia del crioprotector.

Los agentes no penetrantes -proteínas, azúcares de elevado peso molecular, polivinilpirrolidona- actúan osmóticamente promoviendo la deshidratación celular durante la congelación, e impidiendo la formación de grandes cristales de hielo en el interior de las células (Watson, 1990). Estos agentes no atenúan el efecto de la alta concentración intracelular de solutos (“efecto solución”), y por tanto son más efectivos en congelaciones rápidas (Nagase y col., 1968).

2.1.3.3.1. Cómo actúa el glicerol en las células

Durante el procesado ocurren dramáticos movimientos de agua y crioprotector en una célula espermática; respuestas similares, aunque únicas, es posible que ocurran en cada subcompartimento celular (Hammerstedt y col., 1990).

En respuesta a la adición del glicerol al medio isotónico en el que están las células espermáticas en suspensión, tiene lugar un primer ajuste del volumen celular debido a una rápida salida de agua intracelular (arrugamiento de la célula), seguida por un lento retorno al volumen original a medida que penetra el crioprotector.

Cuando el agua extracelular se congela ocurre un segundo ajuste de volumen, motivado por la salida de agua del interior de la célula, en respuesta a las altas concentraciones de sales extracelulares. La descongelación induce cambios de volúmenes análogos pero opuestos. Como los componentes de membrana pueden cambiar a lo largo del ciclo de congelación-descongelación, la cinética del transporte de agua puede no ser equivalente (Hammerstedt y col., 1990).

Los ajustes de volumen de mayor magnitud se producirán cuando las células son expuestas a condiciones hipertónicas durante la congelación. Ello se revierte durante la descongelación y el espermatozoide recupera su volumen isotónico. Otro gran cambio ocurrirá cuando el espermatozoide equilibrado con glicerol, es transferido de un diluyente glicerolado (1300 mOsm.) al tracto genital de la hembra (300 mOsm). A medida que el agua osmóticamente activa entra en la célula, más rápidamente de lo que el glicerol puede

salir, ocurrirá una expansión de 3,4 veces. ¿Cómo pueden las membranas acomodarse a esta gran reducción y expansión de volumen? (Hammerstedt y col. 1990) la respuesta a condiciones moderadamente hipertónicas podría ser a través una íntima aproximación de los sistemas de membrana (Jones, 1971), pero como el mayor espacio lo ocupa el núcleo (núcleoproteínas altamente condensadas y cromatina unidas por puentes disulfuro) (Bedford y Calvin, 1974), el acrosoma y los espacios intramembrana pueden reducir su volumen, pero las reducciones sustanciales del volumen total podrían ser a expensas del tracto intermedio y la cola (Hammerstedt y col., 1990).

2.1.3.3.2. Efectos nocivos del glicerol

Además de los efectos osmóticos, el glicerol actúa directamente sobre las membranas espermáticas (Parks y Graham, 1992). La naturaleza de esta acción no se conoce con exactitud, pero puede relacionarse con:

- alteración directa de las capas de la membrana (Hempling y White, 1984; Anchoroguy y col., 1987; Goodrich y col., 1988; Crowe y col., 1987)
- interacción con los enlaces de proteínas y glucoproteínas (Armitage, 1986)
- inducción de un incremento de la demanda bioenergética (Hammerstedt y col., 1990)

En virtud de su efecto directo sobre las membranas espermáticas y sobre el metabolismo celular, el glicerol tiene una acción perjudicial sobre la fertilidad espermática y esta acción es más acusada a mayor temperatura.

En semen ovino el efecto negativo sobre la fertilidad se ha atribuido a la inducción anticipada de la reacción acrosómica, que sería la responsable de las bajas tasas de concepción del semen congelado (Slavik, 1987). En espermatozoides humanos, la hiperosmolaridad posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (Aitken y col., 1983), y también se ha planteado si la presión osmótica del medio, que se incrementa al añadir el glicerol, podría estimular la reacción acrosómica (Slavik, 1987).

2.1.3.3.3. Concentración óptima de glicerol

Teniendo en cuenta los efectos tóxicos del glicerol y el hecho indiscutible de que su uso es necesario para la supervivencia espermática postdescongelación, es necesario establecer una concentración óptima que represente un compromiso entre el efecto tóxico y el efecto protector (Watson, 1979).

La concentración de glicerol requerida para una supervivencia óptima depende de numerosas consideraciones (constituyentes del diluyente, velocidad de congelación y descongelación, formato de envasado), pero el factor determinante de esta concentración es la especie (Watson, 1979). Los espermatozoides de toro se ven adversamente afectados por niveles superiores al 10% (Polge, 1953; Robbins y col., 1976), siendo la concentración óptima entre el 6 y 9% para espermatozoides congelados en pajuelas (Pickett y Berdston, 1974; Rodríguez y col., 1975; Mortimer y col., 1976; Becker y col., 1977; Unal y col., 1978).

2.2. Periodo de Equilibrado

Algunos autores observaron que la motilidad postdescongelación y la fertilidad de los espermatozoides bovinos se incrementaban si se prolongaba el periodo comprendido entre la adición del glicerol y el comienzo de la congelación. Este intervalo, que normalmente transcurría a 5°C, se denominó “periodo de equilibrado del glicerol” porque se creía que era necesario para que el glicerol penetrase en el interior de los espermatozoides y se equilibrase su concentración a ambos lados de la membrana plasmática. Algunos estudios diseñados para determinar la influencia de este periodo sobre la fertilidad, claramente establecieron que un periodo de equilibrado de varias horas era beneficioso (Salisbury y col., 1978).

Posteriormente se demostró que el glicerol penetra en los espermatozoides de toro, a 25°C ó a 5°C, en 3-5 min (Berndstone y Foote, 1972), sin embargo, la máxima supervivencia postdescongelación se consigue con un tiempo de exposición al glicerol de sólo 10 seg (Berndstone y Foote, 1972), siendo peor con exposiciones de 2 min. o más. Otros autores encontraron que los resultados de motilidad y fertilidad eran prácticamente idénticos, tanto con exposiciones cortas (<1min.) como largas (varias horas). Estos hallazgos cambiaron el concepto del "tiempo de equilibrado", indicando que este periodo

de almacenaje a 5°C probablemente era más necesario para que las membranas espermáticas se adaptasen a las bajas temperaturas, que para la penetración del glicerol.

Se realizaron varios experimentos con distintos tiempos de equilibrado a 5°C, en presencia y ausencia de glicerol, para determinar si se trataba de una interacción entre las células y el glicerol, o era más bien un proceso de adaptación celular a las bajas temperaturas. Varios estudios demostraron que el glicerol puede ser adicionado en cualquier momento de este periodo sin afectar a la fertilidad (Martin, 1965; Jones, 1965, 1969). Los efectos perjudiciales de la exposición al glicerol a elevadas temperaturas, son al menos parcialmente reversibles durante el subsecuente enfriamiento a 5°C. Es posible que la supervivencia se encuentre más severamente afectada si el periodo de enfriamiento pre-congelación se reduce (Salisbury y col., 1978). No obstante, este periodo de almacenaje parece ser menos importante si el descenso de temperatura a 5°C se hace lentamente (Jones, 1969a y b; Ennen y col., 1976; Gilbert y Almquist, 1978). No es muy apropiado, por tanto, referirse a este periodo de enfriamiento como tiempo de equilibrado por su connotación de penetración del glicerol, siendo más apropiado el término de periodo de enfriamiento (Watson, 1979).

Otro aspecto a evaluar fue la conveniencia de añadir al semen el diluyente glicerolado desde la primera dilución, en un único paso, o bien de forma gradual a lo largo de varios pasos. Se comparó la fertilidad de espermatozoides bovinos congelados, glicerolados a 5°C en 1 ó 4 pasos inmediatamente después de que el semen alcanzó esta temperatura, con la de espermatozoides glicerolados a 5°C después de 5 h de enfriamiento (una hora antes de congelar), observándose que la fertilidad no estaba significativamente influenciada por el método de adición del glicerol (revisado Pickett y Berndtson, 1978); y también fue similar cuando las muestras fueron gliceroladas lentamente a lo largo de 2 h, o de forma rápida (Berndtson y Foote 1969, 1972). Bajo ciertas condiciones, la adición del glicerol por pasos, puede incrementar la motilidad postdescongelación; la diferencia generalmente es pequeña, y puede que no se refleje en un incremento de la fertilidad *in vivo* (Salisbury y col., 1978).

2.3. Formato de Envasado

El semen de toro, al igual que el de otras especies, normalmente se envasa en pajuelas de PVC (Cassou, 1965) de 0,25 ó de 0,5 ml, ya que constituyen un formato adecuado para la manipulación, identificación, almacenaje y descongelación.

Cuando se desarrolló la tecnología para la congelación del semen bovino, se utilizaban casi exclusivamente ampollas de cristal. Las ampollas proporcionaban un envase estéril que podía etiquetarse, llenarse y sellarse automáticamente, lo cual previene la contaminación cruzada. Entorno a 1965, Cassou desarrolló las pajuelas de PVC, y a partir de este momento su uso fue generalizado para el envasado del semen bovino, y también del de otras especies. Las pajuelas requieren menos espacio de almacenamiento que las ampollas, y por lo tanto la congelación de las mismas es más rápida y eficaz que las ampollas, y además el esperma de la pajuela puede depositarse en el tracto genital de la hembra con una pérdida mínima de células espermáticas.

Otro formato que permitió obtener buenos resultados de fertilidad fueron los pellets (revisado en Watson, 1979). Este método consiste en la deposición de pequeñas alícuotas de semen diluído en unas depresiones hemisféricas hechas en un bloque de hielo seco, con lo cuál el semen se congela instantáneamente adquiriendo la forma de píldoras o pellets. Los pellets ocupan poco espacio de almacenamiento y pueden considerarse como el formato más barato, sin embargo, tienen algunas desventajas con respecto al uso de pajuelas: es difícil de identificar el toro en cada pellet y la contaminación cruzada con otros espermatozoides o con microorganismos es posible.

El uso de uno u otro método no sólo implica distintos formatos de congelación, sino también marcadas diferencias en la velocidad de congelación del semen (England, 1993).

2.4. Congelación

Mazur (1985) estableció que a cada tipo celular le correspondía una velocidad de congelación óptima para garantizar su supervivencia tras la criopreservación. En lo referente al espermatozoide, la velocidad de congelación afecta a su supervivencia postdescongelación y a la fertilidad. Una congelación excesivamente rápida provoca la formación de grandes cristales de hielo intracelular y los daños serán debidos a la disgregación de las membranas de orgánulos intracelulares. Por el contrario, una congelación excesivamente lenta causará daños relacionados con un gradiente osmótico excesivo durante la formación del hielo extracelular, con lo cuál el daño ocurrirá como consecuencia de los “efectos solución”.

La velocidad óptima de congelación depende del diluyente utilizado, de la concentración del crioprotector y de la especie animal, y a su vez condiciona el procedimiento de descongelación. Además, el volumen de la muestra a congelar y la temperatura a la que se encuentra condicionarán la velocidad de congelación.

Las velocidades óptimas de congelación para el semen de las diferentes especies (Watson, 1990) todas ellas se sitúan dentro del rango de -10 a -100°C /min (Robbins y col., 1976; Fiser y Fairfull, 1984). Temperaturas superiores o inferiores al rango establecido originaron daños irreversibles en las células espermáticas (Bruemmer y col. 1963; Salomon 1970).

La congelación de dosis seminales puede realizarse en vapores de nitrógeno líquido, sobre nieve carbónica o mediante biocongeladores (con velocidades de descenso térmico programadas). La congelación del semen de toro mediante el uso de nieve carbónica y alcohol (método de Rowson y Polge 1950-1952), constituyó el método clásico cuando el semen se envasaba en ampollas de vidrio. Consistía en disminuir gradualmente la temperatura del medio que bañaba a las ampollas, empleando trozos de nieve carbónica, hasta alcanzar la temperatura de -79°C.

La congelación del semen bovino en vapores de nitrógeno líquido tiene su fundamento en establecer una corriente de nitrógeno atomizado mediante un ventilador que actúa a gran velocidad; de este modo se crea una corriente de aire frío que circula de forma continua enfriando el material seminal a través de las ampollas o pajuelas en las que se halla situado. Esta técnica requiere un perfecto control del ritmo de enfriamiento, en el que radica la mayor dificultad de la operación.

Los biocongeladores constituyen sin duda las instalaciones más perfectas y recomendables en la actualidad para la congelación del semen bovino. En dichos biocongeladores es necesario definir una curva de velocidad de congelación que optimice la supervivencia espermática postdescongelación. Existen innumerables trabajos publicados con diferentes rampas de congelación: algunos investigadores sugieren que la velocidad de descenso de la temperatura ha de ser de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 5°C a -15°C , y a ritmo de $-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -15°C a -75°C otros investigadores aconsejan ritmos de -2°C y $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para los límites de 5°C a -15°C y de -15°C a -75°C , respectivamente. De esta temperatura en adelante, la reducción térmica hasta -130°C puede hacerse bruscamente (revisado en Félix Pérez, 1966).

Hoy en día, en muchos centros de IA se utiliza una curva de congelación estándar para semen bovino envasado en pajuelas de 0,25 ml y congeladas en vapores de nitrógeno líquido. La velocidad de descenso térmico normalmente es de $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $+5^{\circ}\text{C}$ hasta -10°C , de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -10°C hasta -100°C y de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -100°C hasta -140°C . Se trata de una curva de congelación rápida que intenta minimizar los daños que implica la congelación.

2.5. Descongelación

Según la teoría bifactorial de crioinjuria propuesta por Mazur (1985), para alcanzar una óptima supervivencia espermática se requiere que la velocidad de descongelación sea acorde con la velocidad de congelación. Sin embargo, varios estudios llevados a cabo con semen bovino obtuvieron resultados que ponen en entredicho esta teoría. Por ejemplo, Almquist y Wiggin (1973 a,b) y Robbins y col. (1973) concluyeron que la velocidad de congelación no afectaba a la motilidad o a la integridad acrosómica postdescongelación

siempre que el semen se descongelase rápidamente. Por el contrario, Rodríguez y col. (1975) observaron que si la congelación del semen era lenta la supervivencia espermática era peor, independientemente de la velocidad de descongelación.

Existen gran variedad de estudios en los que se evaluaron diferentes velocidades de descongelación para el semen bovino (Aamdal y Andersen, 1968; Robbins y col., 1972; 1976; Alquimist y Wiggin, 1973a,b; Pickett y Berdston, 1974; Rodríguez y col., 1975; Wiggin y Alquimist, 1975; Chandler y col., 1984; Dhami y col., 1992; Nur y col., 2003). En general, la mayoría de los trabajos publicados concluyeron que si la velocidad de descongelación es rápida se obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides móviles y mayor integridad acrosómica.

En ausencia de especificaciones concretas para la descongelación del semen bovino, independientemente del tipo de diluyente utilizado y de la velocidad de congelación empleada, actualmente se recomienda descongelar las pajuelas a 33-35°C durante 30-40 segundos (DeJarnette y col., 2000; DeJarnette y Marshall, 2005). Sin embargo, algunos estudios demostraron que la descongelación en un baño de agua a 75°C durante 6,5 segundos permitía obtener mejores porcentajes de motilidad y de integridad acrosómica postdescongelación (Watson, 1990). Y Jonhson y col. (1974) encontraron que descongelando a 36°C-45°C obtenían mayores porcentajes de integridad acrosómica.

III. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

1. Comparar la supervivencia y longevidad espermática post-descongelación del semen bovino congelado con tres diluyentes distintos: Andromed® y Biociphos Plus®, que contienen fosfolípidos extraídos de la soja como principales sustancias protectoras de las membranas espermáticas frente al shock por frío, y Biladyl®, en el que la yema de huevo es la principal sustancia protectora frente al shock por frío.
2. Establecer valores medios para una serie de parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático, obtenidos mediante un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer), en eyaculados de toros Holstein y de raza Rubia Gallega, y clasificados con calidad adecuada para la criopreservación.
3. Determinar la existencia de diferentes subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de toros Holstein: a) determinar la frecuencia de distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones; b) evaluar el efecto de la criopreservación del semen sobre la incidencia de las distintas subpoblaciones; y c) evaluar el efecto de la variabilidad individual sobre la estructura de las subpoblaciones, tanto en semen fresco como congelado.
4. Evaluar el efecto de diferentes temperaturas de descongelación del semen bovino (37°C durante 40 s, 50°C durante 15 s, y 70°C durante 8 s) sobre: a) la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides, y b) la distribución de los espermatozoides en distintas subpoblaciones con patrones de movimiento específicos.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de este trabajo se utilizaron toros pertenecientes a dos centros de inseminación artificial. En los estudios 1, 2 y 4 se trabajó con sementales que permanecían estabulados en el Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia XENÉTICA FONTAO, S.A. (Fontao, Esperante, Lugo), mientras que para el tercer trabajo, se utilizaron toros alojados en el Centro de Inseminación Artificial de Somió (SERIDA), Gijón (Asturias). En todos los estudios se utilizaron toros de raza Holstein, y en el segundo trabajo se utilizaron también toros de raza Rubia Gallega. Todos los sementales comenzaron su etapa como reproductores a los 15 meses de edad, estaban clasificados como 'aptos para la reproducción' y libres de toda enfermedad infecto-contagiosa.

Obtención y evaluación de los eyaculados

En todos los casos la extracción del semen se realizó mediante el uso de vagina artificial (a una temperatura interna de 45°C). De cada toro se obtuvieron dos eyaculados, con un intervalo de 20 min entre los dos saltos, excepto en el tercer estudio en el que únicamente se recogió un eyaculado por toro. Tras la obtención del semen se realizó una primera valoración de la calidad de los eyaculados atendiendo a los siguientes parámetros:

- volumen, determinado por lectura directa en un tubo graduado de 10 ml
- motilidad en masa, determinada mediante examen microscópico subjetivo; los eyaculados se puntuaron en una escala de 0 (ausencia de movimiento) a 5 (ondas con movimiento muy rápido y vigoroso), y aquellos con una puntuación inferior a 3 se descartaron.
- concentración espermática, determinada mediante el uso de fotómetros calibrados; en los trabajos 1, 2 y 4 se utilizó el modelo Photometer SDM 4 (Minitüb, Tiefenbach, Germany), y en el trabajo 3, se utilizó un fotómetro modelo Accucel (IMV, L'Agle, France).

Dilución seminal

Una vez determinado el volumen y la concentración, se mezcló el semen procedente de uno o dos saltos con el diluyente utilizado en cada ensayo. Los diluyentes elaborados a partir de extractos de soja (Biociphos Plus[®], Andromed[®] y Bioxcell[®]), utilizados en los estudios 1 y 3, se adicionaron directamente al eyaculado, a temperatura ambiente, hasta alcanzar una concentración de 80×10^6 espermatozoides (esp)/ml (trabajo 1) ó 92×10^6 esp/ml (trabajo 3). El diluyente elaborado con yema de huevo (Biladyl[®]), utilizado en los estudios 1 y 4, se adicionó en 2 pasos: la solución A (libre de glicerol) se añadió en una primera fase, a temperatura ambiente, hasta alcanzar una concentración de 160×10^6 esp/ml. Una vez diluido con la solución A, el semen se dejó equilibrar a 4°C durante 18 horas, y aproximadamente 1 hora antes de la congelación, se adicionó el mismo volumen de Biladyl[®] solución B (que contenía un 14% de glicerol) a 4°C en 3 etapas, a intervalos de 20 min, para obtener una concentración espermática final de 80×10^6 esp/ml.

Tras la dilución seminal con los respectivos diluyentes, se evaluó subjetivamente la motilidad espermática individual y aquellas muestras con motilidad inferior al 60% se desecharon. Las muestras con un porcentaje de espermatozoides móviles entre el 60 y el 85% se consideraron de calidad ‘buena’ y si el porcentaje de motilidad era superior al 85% se consideraron de ‘calidad muy buena’.

Procesado del semen

Tras la adición del diluyente al semen, que se realizó siempre a temperatura ambiente (20°C), se procedió a bajar gradualmente la temperatura de la suspensión espermática hasta alcanzar los 4°C. El periodo de equilibrado del semen a 4°C fue de 18 horas en todos los ensayos, excepto en el tercer estudio, en el que se redujo a 4 horas.

A continuación se procedió a la identificación (fecha de envasado, nombre del toro, etc.) de pajuelas de 0,25 ml, que se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su uso.

Las operaciones de envasado del semen y sellado de las pajuelas se llevaron a cabo a una temperatura constante de 4°C, siendo realizadas en el interior de una cámara frigorífica. La congelación se realizó en todos los casos en un congelador programable, IMV Digit-cool (IMV, L'Aigle, France), siguiendo la curva estándar para congelación de semen bovino (-5°C/min de +4°C a -10°C; -40°C/min de -10°C a -100°C y -20°C/min de -100°C hasta -140°C).

Diseño experimental

Experimento 1.

Estudio comparativo de tres diluyentes: Andromed®, Biociphos Plus® y Biladyl®. Evaluación de la supervivencia y longevidad espermáticas post-descongelación.

En este experimento se realizó un estudio comparativo de tres diluyentes comerciales previamente utilizados por otros autores para la crioconservación del semen bovino. El objetivo fue establecer cuál de ellos ofrecía mejores condiciones para la supervivencia espermática postdescongelación en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio.

Dos de los diluyentes comerciales utilizados en el experimento 1, Biociphos Plus® (IMV, L'Aigle, France), y Andromed® (Minitüb, Tiefembach, Germany), están elaborados a partir de extractos de soja. Los fosfolípidos vegetales extraídos de la soja actúan como sustancias protectoras de las membranas celulares frente al efecto de las bajas temperaturas. Difieren entre ellos en el tipo de azúcares, en la naturaleza de las sustancias que actúan como tampón, y en los antibióticos que contienen, pero dado que son diluyentes comerciales, su composición exacta es desconocida. Ambos diluyentes se compararon frente al uso de Biladyl® (Minitüb, Tiefembach, Germany), en el que los fosfolípidos y lipoproteínas de la yema de huevo actúan como principales protectores de las membranas espermáticas frente al shock por frío. Los tres diluyentes contienen glicerol como crioprotector.

Se utilizaron 60 eyaculados procedentes de 10 toros Holstein (6 eyaculados por toro). Cada eyaculado fue dividido en 3 volúmenes iguales, que se depositaron en 3 tubos de centrífuga, y a los que posteriormente se añadió el volumen apropiado de los respectivos diluyentes para alcanzar una concentración final de 80×10^6 esp/ml.

El Biladyl[®] fue añadido en 2 pasos, como se ha descrito en el apartado anterior, mientras que el Biociphos Plus[®] y el Andromed[®] fueron adicionados en un solo paso, a temperatura ambiente. Las tres suspensiones espermáticas se mantuvieron a 4°C durante 18 h.

El procesado para la congelación fue realizado siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. La descongelación del semen se realizó en un baño de agua a 37°C durante 20 segundos. De cada diluyente se descongelaron 3 pajuelas simultáneamente, su contenido se vació en un tubo falcon de 5 ml, y el semen se mantuvo en incubación postdescongelación a 37°C durante un periodo de 9 h. Al cabo de 0, 3, 6 y 9 h de incubación, una alícuota de 100 µl se utilizó para evaluar la viabilidad espermática mediante citometría de flujo, utilizando la triple tinción fluorescente descrita por Nagy y col (2003).

Experimento 2.

Determinación de parámetros cinéticos medios en eyaculados de toros de raza frisona y rubia gallega. Influencia de la raza y la edad.

En este trabajo se utilizaron 53 toros, 31 de raza Frisona y 22 de raza Rubia Gallega. Se recogieron un total de 119 eyaculados (entre 1 y 5 eyaculados por toro), de los cuales 58 eyaculados procedían de toros frisonos y 61 de toros rubios. De los 58 eyaculados procedentes de toros frisonos, 29 procedían de animales menores de 3 años de edad y otros 29 de animales mayores de 3 años. De los 61 eyaculados procedentes de toros rubios, 30 procedían de animales menores y 31 de animales mayores de 3 años.

La calidad del semen inicialmente se valoró en base a su volumen, motilidad masal, motilidad individual y concentración espermática. Tras esta primera evaluación, los

eyaculados seleccionados para la congelación fueron analizados con el sistema CASA Sperm Class Analyzer (Microptic S.L., Barcelona, España).

Se tomó una alícuota de 5 μ l de semen fresco y se diluyó con Biociphos Plus[®] para obtener una concentración espermática de aproximadamente 20×10^6 esp/ml. De esta dilución se tomó una alícuota de 5 μ l y se depositó entre un porta y un cubre a 37°C. Se evaluaron 3 campos de microscopio, con contraste de fases, analizándose aproximadamente 600 espermatozoides por muestra. Una vez hechas las 3 capturas, las imágenes analógicas de los espermatozoides fueron digitalizadas y analizadas con el software SCA[®] 2002 Movilidad (Microptic S.L., Barcelona). Los parámetros cinéticos medios, obtenidos para el total de los espermatozoides de cada muestra de semen, fueron los siguientes:

1) Parámetros de velocidad:

- Velocidad curvilínea (VCL, μ m/s): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria por unidad de tiempo.
- Velocidad rectilínea (VSL, μ m/s): distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.
- Velocidad media (VAP, μ m/s): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media por unidad de tiempo.
- Índice de linealidad (LIN, %): es la relación porcentual entre VSL y VCL.
- Índice de rectitud (STR, %): es la relación porcentual entre VSL y VAP.
- Índice de oscilación (WOB, %): es la relación porcentual entre VAP y VCL.

2) Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m): es el desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- Frecuencia de batido (BCF, Hz): es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

Experimento 3.

Identificación de subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de toros Holstein. Influencia de la criopreservación y de la variabilidad individual.

Para este estudio se utilizaron 54 eyaculados procedentes de 9 toros Holstein (6 eyaculados por toro). A los 9 toros se les recogió el semen en los mismos días experimentales, realizándose dos recogidas semanales en 3 semanas consecutivas. Tras una valoración inicial de los eyaculados, se tomó una alícuota para la evaluación de la motilidad espermática mediante el sistema CASA, y el resto del eyaculado se procesó para su congelación.

La calidad del semen inicialmente se valoró en base a sus características macroscópicas, volumen, motilidad masal, motilidad individual y concentración espermática. Tras esta valoración inicial, una alícuota de semen fresco se diluyó con Bioxcell® (IMV, L'Aigle, Francia) para obtener una concentración aproximada de 40×10^6 esp/ml, y esta dilución fue utilizada para analizar la motilidad mediante el sistema CASA. El análisis de la motilidad se realizó de la forma descrita para el experimento anterior, pero en este caso se obtuvieron los parámetros cinéticos individuales que describían el movimiento de cada espermatozoide en particular, en lugar de los parámetros medios que describían el movimiento global del total de los espermatozoides de la muestra.

El procesado para la congelación fue realizado siguiendo la metodología descrita en el experimento 1, con la salvedad de que en este estudio el diluyente utilizado fue Bioxcell®, y el equilibrado del semen se realizó a 5°C durante 4 h, en lugar de a 4°C durante 18 h.

La descongelación del semen se realizó en baño de agua a 37°C durante 40 segundos. De cada eyaculado se descongelaron 3 pajuelas simultáneamente, se mezcló su contenido en un tubo de 5 ml, y se mantuvo en incubación a 37°C durante 4 h. Al cabo de 0, 2 y 4 h de incubación, se tomó una alícuota y se analizó de nuevo la motilidad espermática mediante el sistema CASA, obteniéndose los parámetros cinéticos para cada espermatozoide móvil.

Experimento 4.

Evaluación de diferentes temperaturas de descongelación del semen bovino: efecto sobre la viabilidad espermática post-descongelación y la distribución de los espermatozoides en subpoblaciones con diferentes patrones de movimiento.

Para este estudio se utilizó semen congelado procedente de 10 toros Holstein (un único eyaculado de cada toro). El semen se congeló siguiendo el protocolo descrito en el experimento 1, utilizando el diluyente Bidadyl[®] y un tiempo de equilibrado de 18 h a 4°C.

De cada toro se descongelaron 3 pajuelas, de forma respectiva, a las 3 temperaturas indicadas anteriormente. La descongelación se realizó en un baño de agua a la temperatura apropiada, y el contenido de cada pajuela se vació en un tubo falcon que contenía 250 µl de medio PBS (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) a 37°C. Las tres suspensiones se mantuvieron a 37°C en incubación post-descongelación.

En un primer ensayo, se evaluó el efecto de las diferentes temperaturas de descongelación sobre la motilidad espermática total, determinada subjetivamente, y sobre la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides, evaluada mediante citometría de flujo utilizando la triple tinción fluorescente descrita por Peña y col. (1999), tras 0 y 5 h de incubación post-descongelación.

En un segundo ensayo, se investigó la existencia de subpoblaciones espermáticas definidas por los parámetros cinéticos individuales, y el efecto de las diferentes temperaturas de descongelación sobre la estructura de tales subpoblaciones. Para ello, se utilizó el sistema CASA, de la forma descrita en el experimento 3, obteniéndose los parámetros cinéticos individuales de cada espermatozoide móvil. El análisis de la motilidad se repitió al cabo de 2 h post-descongelación, con el objeto de estudiar la distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones espermáticas en función del tiempo de incubación.

Evaluación de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides mediante citometría de flujo.

El citómetro de flujo utilizado en los experimentos 1 y 4 fue un modelo Epics XL (Coulter Corporation, Miami, FL, USA), que poseía un láser de argón de 15 mW con una longitud de onda de 488 nm.

En todas las muestras se analizaron un mínimo de 100.000 eventos, cuantificándose simultáneamente la fluorescencia verde, naranja y roja. Los parámetros de dispersión frontal (FS) y lateral (SS) de la luz del láser se utilizaron para separar a los espermatozoides de otros eventos en suspensión presentes en las muestras de semen, de forma que sólo fuese cuantificada la fluorescencia emitida por los espermatozoides. La fluorescencia verde se recogió en el sensor FL1, a través de un filtro dicróico de paso largo de 550 nm y de un filtro de paso de banda de 525 nm. La fluorescencia roja se recogió en el sensor FL3, a través de un filtro dicróico de paso largo de 645 nm y de un filtro de paso de banda de 620 nm. Los datos se analizaron utilizando el software System II (Coulter Corporation).

En el experimento 1, las muestras de semen fueron teñidas con la triple tinción fluorescente descrita por Nagy y col (2003), que incluye la combinación de los siguientes fluorocromos:

-SYBR-14, es un compuesto liposoluble capaz de atravesar las membranas celulares intactas de los espermatozoides y unirse al ADN nuclear. Cuando este compuesto es excitado por una longitud de onda de 488 nm emite fluorescencia verde.

-Propidium Iodado (PI), es un compuesto capaz de entrar en los espermatozoides y unirse al ADN nuclear, pero sólo cuando las membranas celulares se encuentran alteradas. Al ser excitado a 488 nm emite fluorescencia roja.

La combinación de ambos fluorocromos permite identificar y cuantificar poblaciones de espermatozoides con la membrana plasmática intacta (emiten fluorescencia verde) o con la membrana dañada (emiten fluorescencia roja).

-Lectina de cacahuete (*Arachis hypogaea*) marcada con ficoeritrina (PE-PNA), esta lectina tiene gran afinidad por la membrana acrosomal interna y el contenido acrosomal de los espermatozoides de mamíferos. Cuando las membranas plasmática y acrosomal externa de los espermatozoides se encuentran alteradas, permiten la entrada y unión de la lectina al compartimento acrosomal, que al estar marcada con ficoeritrina va a emitir fluorescencia naranja cuando es excitada por un láser de 488 nm.

La triple tinción fluorescente, por tanto, permite identificar y cuantificar cuatro subpoblaciones espermáticas: 1) una subpoblación de espermatozoides teñidos sólo con SYBR-14, cuyas membranas plasmática y acrosomal están intactas; 2) otra subpoblación de espermatozoides teñidos con SYBR-14 y con PE-PNA pero no con PI, cuya membrana plasmática está intacta, y por tanto impide la entrada del PI, pero con las membranas acrosomales dañadas, dando paso a la lectina; 3) una tercera subpoblación de espermatozoides teñidos con PI y PE-PNA, cuyas membranas plasmática y acrosomal ambas están dañadas; y 4) una cuarta subpoblación de espermatozoides sólo teñidos con PI, cuya membrana plasmática está alterada pero la acrosomal permanece intacta.

En el experimento 4, se utilizó la triple tinción fluorescente descrita por Peña y col (1999), análoga a la anterior, en la que, en lugar de SYBR-14, el fluorocromo Carboxy-SNARF-1, en su forma acetoximetil éster, (SNARF) se combina con PI y FITC-PNA (lectina de cacahuete marcada con isotiocianato de fluoresceína).

El SNARF es un compuesto liposoluble capaz de atravesar la membrana celular y penetrar en el interior de espermatozoides vivos y muertos. Es un indicador de pH intracelular, y en condiciones próximas a la neutralidad (7.0-7.2) emite fluorescencia naranja, mientras que a pH más alcalino la fluorescencia va cambiando hacia el rojo.

Esta triple tinción, como la anterior, permite identificar cuatro subpoblaciones espermáticas: 1) espermatozoides teñidos sólo con SNARF, que se corresponden con células cuyas membranas plasmática y acrosomal se encuentran íntegras; 2) otra subpoblación de espermatozoides teñidos con SNARF y con FITC-PNA pero no con PI, cuya membrana plasmática está intacta pero la acrosomal se encuentra dañada; 3) una tercera subpoblación de espermatozoides teñidos con PI y FITC-PNA, con ambas

membranas alteradas; y 4) una cuarta subpoblación de espermatozoides sólo teñidos con PI, con la membrana plasmática alterada pero el acrosoma intacto.

Descripción del sistema CASA utilizado

El sistema CASA utilizado en los estudios 2, 3 y 4, fue un Sperm Class Analyzer de Microptic S.L. (Barcelona). El análisis se basó en la captura de 16 imágenes fotográficas consecutivas, tomadas a intervalos de 40 ms, de cada campo microscópico seleccionado. Las imágenes se digitalizaron mediante el software SCA 2002[®] Movilidad, que incluía los siguientes parámetros predeterminados: número de imágenes capturadas por segundo, 25; VCL mínima para espermatozoides lentos, 20 $\mu\text{m/s}$; VCL máxima para espermatozoides lentos, 60 $\mu\text{m/s}$; VCL máxima para espermatozoides medios 110 $\mu\text{m/s}$; conectividad (distancia máxima entre dos objetos de dos imágenes sucesivas para que sea considerado el mismo objeto), 15 μm ; número mínimo de imágenes para calcular ALH, 5. En todos los estudios se utilizó un microscopio de contraste de fases con platina a 37°C y objetivos de 100 (trabajos 2 y 3) o de 200 (trabajo 4) aumentos.

Análisis estadístico

En todos los experimentos, los datos relativos a porcentajes de espermatozoides móviles, de integridad de las membranas plasmática y acrosomal, o a valores medios de los parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático (variables dependientes), se analizaron utilizando el procedimiento GLM (Modelo Lineal General), considerando los efectos del tratamiento, toro, replicado y las interacciones entre ellos (variables independientes) y las diferencias entre diferentes tratamientos se determinaron mediante tests HDS de Tukey.

En los estudios en los que la variable dependiente se analizó a diferentes intervalos de tiempo (experimentos 1 y 4) se utilizó la modalidad GLM para medidas repetidas.

El estudio de subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específico (experimentos 3 y 4) se realizó mediante un análisis de clusters multivariante, utilizando el

procedimiento k-medias. En ambos experimentos, las subpoblaciones espermáticas se determinaron inicialmente sobre el número total de espermatozoides analizados (16.740 en el experimento 3 y 6.115 en el experimento 4). El modelo K-medias utiliza distancias euclídeas calculadas a partir de las variables cuantitativas especificadas (en este caso los parámetros cinéticos) para separar el total de las observaciones en un número reducido de clusters. Tras el análisis, cada espermatozoide fue asignado a un único cluster, de manera que aquellos espermatozoides con parámetros cinéticos muy próximos eran asignados al mismo cluster, mientras que los que tenían parámetros muy dispares se asignaron a diferentes clusters. Los clusters se construyeron mediante un proceso iterativo, de tal manera que las distancias entre observaciones del mismo cluster fuesen las mínimas, y las distancias entre observaciones de diferentes clusters fueran las máximas.

Cuando se utiliza el modelo k-medias es necesario especificar de antemano el número de clusters que se quieren construir. Para determinar este número, previamente se realizó un análisis de dendogramas jerárquicos, utilizando el método de Ward, de cada eyaculado individual, y el número de clusters a especificar al modelo k-medias, fue el que predominaba en la mayoría de las muestras de semen individuales.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

V. RESULTADOS

Experimento 1.

*Estudio comparativo de tres diluyentes: Andromed®, Biociphos Plus® y Biladyl®.
Evaluación de la supervivencia y longevidad espermáticas post-descongelación.*

Las muestras de semen procesadas con Biladyl® mostraron mayor supervivencia y longevidad espermática ($P < 0,001$) que las procesadas con los diluyentes elaborados a base de extractos de soja. En las muestras procesadas con Biladyl®, el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto fue de 47,9% a las 0 h post-descongelación, y de 30,3% tras 9 h de incubación. En cambio, las muestras procesadas con Andromed® mostraron valores de 38,5% y 17,3%, tras 0 y 9 h de incubación, respectivamente, y las procesadas con Biociphos Plus® mostraron una viabilidad espermática de 34,9% y 21,6%, tras 0 y 9 h de incubación, respectivamente.

La proporción de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto, en muestras congeladas con Biladyl® o con Biociphos Plus®, no sufrió variaciones significativas durante 6 h de incubación post-descongelación. Las muestras de semen congeladas con Andromed®, en cambio, a las 6 h post-descongelación mostraron un descenso significativo de la viabilidad espermática. No obstante, el descenso más drástico de la viabilidad, con los 3 diluyentes, se registró al cabo de 9 h de incubación a 37°C.

El toro tuvo un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, pero la interacción entre toro y diluyente no fue significativa.

El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma dañado, con cualquiera de los tres diluyentes utilizados, fue inferior al 5% durante las 6 primeras horas de incubación. Tras 9 h de incubación, las muestras procesadas con Biociphos Plus® mantuvieron el menor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma dañado ($3,2 \pm 6,2\%$). Dicha población fue superior ($P < 0,001$) en muestras congeladas con Biladyl® ($9,5 \pm 12,0\%$) o con Andromed® ($8,7 \pm 11,1\%$).

El porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma dañado varió entre toros ($P < 0,05$), pero la interacción entre toro y diluyente no fue significativa. También el replicado tuvo un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la integridad de las membranas

plasmática y acrosomal, pero la interacción entre replicado y diluyente no fue significativa.

Experimento 2.

Determinación de parámetros cinéticos en eyaculados de toros de raza frisona y rubia gallega. Influencia de la raza y de la edad.

La raza, la edad y la interacción entre ambas, tuvieron efectos significativos ($P < 0,001$) sobre el volumen de eyaculado, la concentración espermática, el número total de espermatozoides y el porcentaje de motilidad subjetiva.

Los toros de raza Frisona mayores de 3 años produjeron mayor volumen de semen que los frisonos jóvenes ($9,2 \pm 2,2$ vs $5,68 \pm 2,3$ ml), y que los toros rubios de ambos grupos de edad (<3 años: $5,59 \pm 1,9$ ml y >3 años: $6,29 \pm 1,7$ ml). Por el contrario, la concentración espermática fue mayor para la raza Rubia que para la Frisona ($1.292,4 \pm 359,3 \times 10^6$ esp/ml vs $1.100,5 \pm 365,6 \times 10^6$ esp/ml), sin diferencias significativas entre grupos de edad. El número total de espermatozoides del eyaculado no dependió de la raza, pero sí de la edad, y fue mayor en animales mayores de 3 años ($8.638,5 \pm 3.676,9 \times 10^6$ vs $7.108,5 \pm 3.142,0 \times 10^6$ esp). La motilidad espermática valorada de forma subjetiva, resultó ser mayor en toros rubios que en frisonos de más de 3 años ($83,5 \pm 7,0$ vs $78,1 \pm 7,2$ %), pero entre los jóvenes de ambas razas no se observaron diferencias.

Los porcentajes de espermatozoides móviles obtenidos con el CASA, así como los de espermatozoides rápidos y medios, no variaron ni con la raza ni con la edad de los toros, pero se observó mayor ($P < 0,01$) porcentaje de espermatozoides lentos en eyaculados de toros frisonos que en los de toros rubios (Tabla 1).

Los valores medios de algunos parámetros cinéticos, para ambas razas y edades, se muestran en la Tabla 1. Se observó que la raza tenía un efecto significativo sobre algunos parámetros cinéticos, especialmente en la subpoblación de espermatozoides rápidos, pero no había diferencias entre ambos grupos de edad. En los eyaculados de toros frisonos, los espermatozoides clasificados como rápidos tenían mayor velocidad y una trayectoria más rectilínea (mayor VSL, VAP, LIN y menor ALH) que los espermatozoides de dicha subpoblación en eyaculados de toros rubios.

Resultados

Tabla 1. Porcentajes medios (\pm DE) de espermatozoides móviles totales (VCL>20 μ m/s), rápidos (VCL>110 μ m/s), medios (VCL >60 y <110 μ m/s) y lentos (VCL>20 y <60 μ m/s), así como de algunos parámetros cinéticos determinados en eyaculados de toros de raza Frisona y Rubia Gallega, mayores y menores de 3 años de edad.

Parámetros cinéticos	Raza Frisona		Rubia Gallega	
	<3 años	>3 años	<3 años	>3 años
Móviles (%)	91,0 \pm 3,0	90,8 \pm 4,2	89,8 \pm 4,1	91,5 \pm 4,2
Rápidos (%)	55,9 \pm 12,2	50,9 \pm 14,3	55,0 \pm 12,1	53,4 \pm 12,4
Medios (%)	23,4 \pm 7,8	27,2 \pm 12,6	24,6 \pm 8,6	27,8 \pm 10,4
Lentos (%)	11,7 \pm 4,2 a	12,7 \pm 4,2 a	10,3 \pm 2,8 b	10,4 \pm 3,6 b
VCL total	128,9 \pm 16,9	126,0 \pm 19,9	127,8 \pm 13,8	128,3 \pm 15,9
VCL rápidos	162,2 \pm 11,9	161,0 \pm 13,0	158,5 \pm 9,4	160,8 \pm 10,9
VCL medios	91,3 \pm 5,9 a	93,5 \pm 2,8 a	94,6 \pm 1,8 b	94,3 \pm 2,4 b
VCL lentos	38,7 \pm 3,3	40,8 \pm 2,2	40,0 \pm 1,9	39,9 \pm 1,9
VSL total	82,1 \pm 11,8	78,6 \pm 15,1	77,7 \pm 15,1	78,5 \pm 12,1
VSL rápidos	106,7 \pm 9,1 a	102,2 \pm 12,9 a	98,4 \pm 10,9 b	99,2 \pm 10,7 b
VSL medios	54,2 \pm 6,6	56,6 \pm 5,3	55,5 \pm 4,2	56,8 \pm 5,9
VSL lentos	17,3 \pm 3,0	17,6 \pm 2,9	16,8 \pm 2,6	16,5 \pm 2,8
VAP total	100,2 \pm 13,8	97,0 \pm 17,5	96,2 \pm 12,0	97,1 \pm 14,1
VAP rápidos	128,5 \pm 10,0 a	125,1 \pm 13,5 a	120,7 \pm 10,6 b	122,2 \pm 11,7 b
VAP medios	68,0 \pm 6,1	70,4 \pm 4,2	69,9 \pm 3,7	70,4 \pm 4,9
VAP lentos	24,7 \pm 3,1	25,4 \pm 2,7	24,4 \pm 2,2	24,2 \pm 2,5
LIN total	63,8 \pm 4,3 a	62,2 \pm 4,2 a	60,7 \pm 4,4 b	61,0 \pm 3,5 b
LIN rápidos	65,9 \pm 4,6 a	63,4 \pm 5,0 a	62,0 \pm 5,0 b	61,6 \pm 3,8 b
LIN medios	59,3 \pm 5,6	60,5 \pm 4,9	58,7 \pm 4,3	60,1 \pm 5,3
LIN lentos	43,5 \pm 5,3	43,0 \pm 5,2	41,8 \pm 5,2	41,4 \pm 5,8
STR total	81,9 \pm 2,6	80,9 \pm 2,8	80,6 \pm 2,7	80,7 \pm 2,1
STR rápidos	83,0 \pm 2,9	81,6 \pm 3,3	81,4 \pm 3,1	81,1 \pm 2,2
STR medios	79,6 \pm 3,7	80,2 \pm 3,2	79,3 \pm 2,5	80,5 \pm 3,3
STR lentos	69,7 \pm 5,0	69,1 \pm 4,3	68,3 \pm 4,9	68,1 \pm 5,3

VCL, VSL, VAP: μ m/s; LIN, STR: %

a, b: diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05).

Experimento 3.

Identificación de subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de toros Holstein. Influencia de la criopreservación y de la variabilidad individual.

La motilidad espermática total en los eyaculados frescos de los 9 toros fue de 82,3 \pm 9,8%, y tras la criopreservación descendió a 75,8 \pm 12,8%, 69,8 \pm 16,3% y 59,4 \pm 20,9%, respectivamente, en evaluaciones hechas a las 0, 2 y 4 h de incubación post-descongelación.

Entre los distintos toros del estudio hubo diferencias significativas (p<0.01) en la motilidad total, tanto en semen fresco, como tras la descongelación o durante la

incubación post-descongelación, sin embargo, no hubo correlación significativa entre la motilidad total del eyaculado y la motilidad total a las 0, 2 ó 4 h post-descongelación.

Tras el análisis de clusters multivariante realizado sobre 16.740 espermatozoides se identificaron cuatro subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento:

-Subpoblación 1: constituida por espermatozoides con una velocidad moderada ($VCL=70,1\pm19,3\ \mu\text{m/s}$; $VSL=48,3\pm15,4\ \mu\text{m/s}$; $VAP=54,3\pm16,0\ \mu\text{m/s}$) pero de trayectoria muy progresiva ($LIN=69,8\pm14,0\%$; $STR=88,9\pm9,5\%$; $ALH=2,3\pm0,9\ \mu\text{m}$; y $BCF=9,0\pm4,1\ \text{Hz}$). Del total de los espermatozoides, el 23% fueron asignados a esta subpoblación.

-Subpoblación 2: representada por espermatozoides con un movimiento muy activo pero no progresivo, indicado por elevados valores de VCL ($118,4\pm24,0\ \mu\text{m/s}$) y de ALH ($4,6\pm1,4\ \mu\text{m}$), junto con bajos valores de LIN ($38,1\pm12,4\ \%$) y de STR ($59,4\pm19,0\ \%$). Esta subpoblación podría considerarse con un movimiento similar a la hipercinesis. El 16% del total de espermatozoides formaba parte de esta subpoblación.

-Subpoblación 3: incluía al 35% del total de espermatozoides, y éstos mostraban muy baja velocidad ($VCL=29,5\pm15,6\ \mu\text{m/s}$; $VSL=8,9\pm6,0\ \mu\text{m/s}$; $VAP=15,0\pm8,7\ \mu\text{m/s}$) y trayectoria no progresiva ($LIN=31,4\pm16,5\%$; $STR=59,2\pm19,6\%$; $WOB=51,5\pm15,0\%$).

-Subpoblación 4: representada por el 25% de la población total, incluía a aquellos espermatozoides con movimiento más rápido y progresivo, indicado por los valores más elevados de VCL ($131,0\pm24,2\ \mu\text{m/s}$), VSL ($95,6\pm19,9\ \mu\text{m/s}$), VAP ($107,5\pm19,7\ \mu\text{m/s}$) y BCF ($9,5\pm4,0\ \text{Hz}$), junto con una elevada LIN ($73,9\pm13,1\ \%$), STR ($89,1\pm9,7\ \%$), WOB ($82,8\pm10,3\ \%$) y moderada ALH ($3,7\pm1,5\ \mu\text{m}$).

El porcentaje de espermatozoides en cada subpoblación varió significativamente ($p<0.01$) con la criopreservación del semen. En eyaculados frescos el 34,1% de los espermatozoides formaba parte de la subpoblación 4, pero tras la descongelación, solo el 20,6% de los espermatozoides fue asignado a esta subpoblación, y tras 2 y 4 h de incubación post-

descongelación, esta subpoblación sólo estuvo representada por un 15,2% y un 7,3% del total de espermatozoides. Por el contrario, la subpoblación 3, que en eyaculados frescos representaba al 10,7% del total de los espermatozoides, tras la criopreservación, se incrementó hasta un 27,2%. El porcentaje de espermatozoides asignado a la subpoblación 1, sin embargo, no varió de forma significativa con la congelación o durante la incubación post-descongelación.

En semen fresco, el porcentaje de espermatozoides incluido en la subpoblación 4 varió de forma significativa ($P < 0,05$) entre toros, sin embargo, los porcentajes de espermatozoides asignados a las otras tres subpoblaciones no mostraron diferencias entre toros.

Tras la descongelación del semen, y durante la mayor parte de la incubación post-descongelación, la subpoblación 4 fue la que estableció las diferencias significativas entre toros. Tras 4 h de incubación, esta subpoblación había descendido considerablemente en todos los toros, y fue entonces la subpoblación 1 la que estableció diferencias significativas. Las subpoblaciones 2 y 3, prácticamente no mostraron diferencias entre los distintos toros.

Se encontró una correlación significativa ($p < 0.01$) entre la proporción de espermatozoides asignada a la subpoblación 4 en los eyaculados frescos y esa subpoblación en semen congelado a las 0 ($r = 0.473$), 2 ($r = 0.513$) y 4 h postdescongelación ($r = 0.450$).

Como se ha descrito, el toro tuvo un efecto significativo sobre la distribución de los espermatozoides en subpoblaciones, tanto en muestras de semen fresco como congelado. Sin embargo, el replicado (o día experimental) o la interacción entre toro y replicado no tuvieron efecto significativo sobre la estructura de las subpoblaciones.

Hubo diferencias significativas entre las muestras de semen fresco y congelado en los parámetros que definían a las cuatro subpoblaciones. En general, tales diferencias indicaron que, en las cuatro subpoblaciones, la velocidad de los espermatozoides disminuyó tras la descongelación y también durante la incubación post-descongelación.

Experimento 4.

Evaluación de diferentes temperaturas de descongelación del semen bovino: efecto sobre la viabilidad espermática post-descongelación y la distribución de los espermatozoides en subpoblaciones con diferentes patrones de movimiento.

El método de descongelación (35°C / 40 s; 50°C/ 15 s; ó 70°C / 8 s) no tuvo efecto significativo ni sobre la motilidad espermática, determinada subjetivamente o con un sistema CASA, ni sobre el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto, en ninguna las evaluaciones post-descongelación (Tabla 2). Independientemente del método de descongelación, el tiempo de incubación causó una reducción significativa ($P<0,001$) tanto de la motilidad (subjetiva o determinada con CASA) como de la viabilidad espermática.

Tabla 2. Porcentajes (medias \pm DE) de motilidad (determinada subjetivamente y mediante un sistema CASA) y de viabilidad espermática (determinada por citometría de flujo) en muestras de semen bovino descongelado a diferentes tasas (n=10).

Evaluaciones post-descongelación	Temperatura /tiempo de descongelación		
	35°C / 40 s	50°C/ 15 s	70°C / 8 s
Mot. Subj. 0 h	64,0 \pm 14,5	59,0 \pm 11,0	61,0 \pm 13,3
Mot. Subj. 5 h	7,4 \pm 9,1	17,4 \pm 11,7	6,3 \pm 8,8
Mot. CASA 0h	82,7 \pm 7,5	80,9 \pm 10,3	86,1 \pm 6,7
Mot. CASA 2h	66,7 \pm 17,1	67,4 \pm 17,7	78,6 \pm 13,8
Viabilidad 0 h	73,4 \pm 15,0	73,3 \pm 13,3	74,4 \pm 7,7
Viabilidad 5 h	55,5 \pm 19,9	62,1 \pm 9,7	66,7 \pm 11,0

Tras un análisis de clusters multivariante sobre un total de 6115 espermatozoides móviles, se identificaron cuatro subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos, que eran análogas a las descritas en el experimento anterior:

- La *subpoblación 1* estaba representada por espermatozoides de velocidad moderada (VCL=79,4 \pm 17,7 μ m/s; VSL=49,9 \pm 13,3 μ m/s; VAP=57,4 \pm 13,5 μ m/s) pero de trayectoria progresiva (LIN=63,4 \pm 12,7%; STR=86,9 \pm 9,3%; ALH=2,98 \pm 0,89 μ m). El porcentaje de espermatozoides que constituían esta subpoblación fue del 27%.

- La *subpoblación 2* estaba integrada por espermatozoides con movimiento rápido pero no progresivo (VCL=104,4 \pm 24,4 μ m/s; VSL=31,8 \pm 12,3 μ m/s; VAP=61,9 \pm 18,0 μ m/s;

LIN=30,5±9,7%; STR=52,3±16,7%; ALH=4,56±1,21 µm), considerado como algo similar a la hipercinesis. El 15% del total de los espermatozoides formaba parte de esta subpoblación.

- La *subpoblación 3*, constituida por el 34% del total de espermatozoides, eran células con muy baja velocidad (VCL=28,8±15,6 µm/s; VSL=9,0±6,0 µm/s; VAP=15,9±8,8 µm/s) y movimiento no progresivo (LIN=32,8±16,7%; STR=56,5±19,7%; ALH=1,49±0,77 µm).

- La *subpoblación 4*, representada por el 23% del total de espermatozoides móviles, incluía espermatozoides con un movimiento muy rápido (VCL=132,4±23,6 µm/s; VSL=89,2±20,4 µm/s; VAP=102,5±19,5 µm/s) y muy progresivo (LIN=68,3±14,1%; STR=87,2±11,3%; ALH=4,28±1,39 µm).

El método de descongelación *per se* no tuvo influencia significativa sobre la distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones, sin embargo, la interacción entre método de descongelación y tiempo de incubación tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de espermatozoides asignado a la subpoblación 4.

En las muestras de semen descongeladas a 35°C, la subpoblación 4 se redujo de forma importante ($p=0.017$) tras 2 h de incubación post-descongelación (24,1% a las 0 h vs 8,3% a las 2 h); en cambio, esta subpoblación no varió de forma significativa cuando el semen fue descongelado a 50°C (16,7% a las 0 h vs 18,1% a las 2 h) o a 70°C (24,1% a las 0 h vs 16,5% a las 2 h).

Las otras 3 subpoblaciones no se vieron influenciadas por la interacción entre el método de descongelación y el tiempo de incubación.

El método de descongelación tuvo efecto significativo ($P<0,05$) sobre alguno de los parámetros cinéticos que definían a las 4 subpoblaciones. Por ejemplo, los espermatozoides asignados a la subpoblación 4 tenían un movimiento más rápido (mayor VCL, VSL, VAP, ALH y BCF) cuando la descongelación fue a 35°C que cuando fue a 50°C o a 70°C.

Para los tres métodos de descongelación, algunos de los parámetros cinéticos que definían a cada subpoblación, variaron de forma significativa durante las 2 h de incubación post-descongelación. El cambio más interesante se observó en muestras descongeladas a 50°C: los espermatozoides asignados a la subpoblación 4 mostraron un movimiento aún más rápido y progresivo tras 2 h de incubación que justo tras la descongelación.

VI. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio (experimento 1) indicaron claramente que, si el semen se va a mantener a 4°C durante un periodo de 18 h antes de su congelación, es más recomendable utilizar un diluyente elaborado en base a yema de huevo, como es el Biladyl®, que diluyentes elaborados en base a extractos de soja, como son Andromed® o Biociphos Plus®.

El uso de Biladyl® no sólo implica la utilización de yema de huevo como principal sustancia protectora de las membranas espermáticas frente al shock por frío, si no que también implica la adición del glicerol en tres pasos, al final del periodo de refrigeración. Por el contrario, cuando el semen se diluye en Andromed® o Biociphos Plus®, el glicerol ya va incluido en el diluyente y por tanto se añade al semen desde la primera dilución.

Varios estudios diseñados para evaluar el efecto de añadir el glicerol al semen bovino antes, durante, o al final de un periodo de refrigeración de entre 4 y 18 h a 5°C en uno o en varios pasos, llevaron a la conclusión de que el glicerol podía ser adicionado al semen en cualquier momento de este periodo sin que la calidad espermática o la fertilidad del semen se viesen afectadas (revisado por Pickett y Berndtson, 1978). Por lo tanto, en el presente estudio, el efecto beneficioso del Biladyl® parece más probable que fuese debido a un mayor efecto protector de las membranas espermáticas por parte de la yema de huevo que de los lípidos de la soja.

Varios estudios en los que se evaluó la eficacia de Andromed® o de Biociphos Plus® para la criopreservación del semen bovino, en comparación con el uso de diluyentes clásicos elaborado en base a Tris-yema de huevo, mostraron resultados contradictorios: por ejemplo, Hinsch y col. (1997 a, b) y Gil y col. (2000) no observaron diferencias significativas en la motilidad post-descongelación, la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, el estado de capacitación de los espermatozoides o la fertilidad del semen bovino congelado con Biociphos Plus® o con Triladyl®. Sin embargo, otros autores observaron que el uso de Biociphos Plus® estaba asociado a menor tasa de no retorno a los 56 días (Van Wagendonk-de Leeuw y col., 2000), menor motilidad,

viabilidad o resistencia osmótica de los espermatozoides tras su descongelación (Thun y col., 2002), o a una menor longevidad espermática durante la incubación post-descongelación (Christensen y col., 2005).

En relación al uso de Andromed®, los resultados obtenidos por los distintos autores tampoco son concluyentes: Müller-Schlösser y col. (2001) no encontraron diferencias significativas en la motilidad post-descongelación, en el porcentaje de reacción acrosómica en respuesta a proteínas de la zona pelúcida o a progesterona, o en la fertilidad *in vivo* del semen congelado con Andromed® o con un diluyente Tris-yema. Aires y col. (2003), en cambio, no observaron diferencias significativas en la calidad post-descongelación del semen evaluada *in vitro*, pero obtuvieron mayor fertilidad *in vivo* cuando el semen había sido congelado con Andromed®. Sin embargo, Nehring y Rothe (2003) obtuvieron tasas de no retorno similares utilizando Andromed® o Triladyl® con dosis de inseminación de 15 millones de espermatozoides, pero cuando redujeron la dosis de inseminación a 5 millones de espermatozoides, el descenso de la tasa de no retorno fue casi del doble para Andromed® que para Triladyl®.

Estos resultados tan dispares probablemente indican que la diferencia entre ambos tipos de diluyentes en lo que se refiere a su capacidad de criopreservación del semen bovino, es pequeña; pero también podrían estar relacionados con diferencias entre las distintas razas de toros utilizadas por los distintos autores. No obstante, es necesario remarcar que, en todos los trabajos anteriormente mencionados, los diferentes autores han utilizado periodos de equilibrado del semen, a una temperatura de 4-5°C, comprendidos entre 2 y 5 h.

Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo de crioprotección de las membranas espermáticas por parte de la fracción de lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo. Manjunath y col. (2002) demostraron que las lipoproteínas de la yema de huevo tienen una gran afinidad por las proteínas del plasma seminal bovino (BSP: bovine seminal plasma proteins); esta unión se produce de forma rápida, específica, saturable y estable, y se mantiene durante la congelación y la descongelación. Las BSP se sabe que durante la eyaculación, se unen a la membrana plasmática de los espermatozoides

recubriéndola superficialmente (Manjunath y cols., 1994), e inducen la salida de fosfolípidos y colesterol de la membrana provocando su desestabilización, y este efecto depende de la concentración y del tiempo de exposición a las BSP (Thérien y cols. 1998, 1999). La pérdida de fosfolípidos y de colesterol, inducida por la exposición a las proteínas del plasma seminal, hace que se desestabilice la membrana y se reduzca su resistencia a la congelación (Darin-Bennet y White, 1977; White, 1993). Las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo, al unirse a las proteínas del plasma seminal presentes en el semen, neutralizarían su efecto perjudicial sobre las membranas espermáticas protegiéndolas durante el enfriamiento y la congelación (Manjunath y col., 2002). En el presente estudio, las lipoproteínas de la yema de huevo pueden haber contrareestado o atenuado los efectos nocivos de las BSP sobre las membranas espermáticas, mientras que los fosfolípidos de la soja puede que no hayan tenido esa capacidad. En este estudio, las membranas de espermatozoides diluídos en Andromed® o Biociphos Plus® habrían estado expuestas al efecto de las BSP durante un periodo de 18 h, mientras que en los trabajos anteriormente reseñados este periodo fue tan sólo de 2-5 h. Es probable, por tanto, que el prolongado periodo de equilibrado utilizado en este estudio haya determinado las contundentes diferencias observadas entre ambos tipos de diluyentes.

Al estudiar el efecto de la raza y de la edad sobre la producción de semen (experimento 2), se observó que los toros frisonos mayores de 3 años produjeron eyaculados de mayor volumen que los toros rubios de ambos grupos de edad (mayores y menores de 3 años de edad). En general, los toros de razas lecheras se sabe que producen eyaculados de mayor volumen que los de razas de aptitud cárnica (Cole y Cupps, 1984), y nuestros resultados confirmaron este hecho. La concentración espermática, en cambio, fue mayor en eyaculados de toros rubios que en los de toros frisonos, y por tanto, el número total de espermatozoides del eyaculado resultó ser similar para ambas razas. Esto probablemente indica que la diferencia entre las dos razas en el volumen de eyaculado se debe más a una diferencia en la cantidad de plasma seminal, emitido por las glándulas sexuales accesorias durante la eyaculación, que a una diferencia en la producción testicular. De hecho, el número total de espermatozoides presentes en el eyaculado no se

vio influido por la raza, pero sí por la edad del toro, siendo mayor en toros de más de 3 años. El tamaño y el peso del parénquima testicular son parámetros altamente correlacionados con el número total de células de Sertoli (Berndtson et al., 1987), con la producción de espermatozoides (Coulter et al., 1976; Madrid et al., 1988) y con la calidad espermática (Bailey et al., 1996) y fertilidad *in vivo* del semental (Elmore et al., 1976; Coulter and Foote, 1979). Era de esperar, por tanto, que los toros de mayor edad produjesen mayor cantidad de espermatozoides que los más jóvenes, muchos de los cuales no habrían completado su crecimiento corporal ni la maduración de sus órganos genitales.

Cuando se utiliza un sistema CASA se debe tener en cuenta que los resultados que proporciona únicamente son aplicables y repetibles en otro laboratorio de análisis seminal, siempre y cuando se utilice el mismo equipo. Los resultados obtenidos tras el análisis de las mismas muestras de semen en distintos laboratorios y con diferentes equipos pueden ser muy dispares. Estas diferencias pueden ser debidas a que diferentes sistemas pueden incorporar distintas especificaciones técnicas (nº de imágenes por segundo, límites de tamaño, límites de velocidad para espermatozoides inmóviles, lentos, etc.), pero fundamentalmente se deben a que los distintos equipos a veces utilizan algoritmos muy diferentes para calcular el mismo parámetro cinético, con lo cuál es muy probable que en realidad se estén calculando parámetros distintos (Holt et al., 1994). Por otra parte, el usuario es una fuente de variabilidad tan o incluso más importante que la impuesta por las diferencias técnicas existentes entre los distintos equipos (Holt et al., 1994).

Entre los valores medios de los parámetros descriptores de la motilidad espermática obtenidos mediante el sistema CASA (experimento 2), quizás el dato más relevante fue la diferencia observada entre toros frisonos y rubios en lo que se refiere al porcentaje de espermatozoides clasificados como rápidos. En toros frisonos, el grupo de espermatozoides rápidos describían un movimiento de mayor velocidad y de trayectoria más rectilínea (mayor VSL, VAP, LIN, WOB y menor ALH) que dicho porcentaje en eyaculados de toros rubios. Este hecho podría indicar la existencia de diferencias genéticas en la calidad del semen entre ambas razas. En un estudio reciente (Hoflack y col., 2007), se ha demostrado la existencia de diferencias significativas entre eyaculados de toros Azul

Belga y Holstein. Los porcentajes medios de espermatozoides móviles y progresivos, así como la velocidad y linealidad de las trayectorias espermáticas fueron superiores en eyaculados de toros Holstein. Los autores del estudio sugieren que un componente genético podría ser la base de dichas diferencias, probablemente como consecuencia de una mayor presión de selección sobre la raza Holstein. A lo largo de los años, y a nivel mundial, se han ido seleccionando los sementales Holstein de mayor fertilidad para su uso en IA, pero la presión de selección ha sido mucho menor para la raza Azul Belga o la Rubia Gallega.

Los resultados de este estudio (experimentos 3 y 4) demostraron que en eyaculados bovinos, al igual que en los de otras especies de mamíferos, se pueden diferenciar varias subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento. Tanto en semen fresco como en congelado se identificaron 4 subpoblaciones espermáticas determinadas en base a 8 parámetros cinéticos. Es de destacar que ambos experimentos se realizaron utilizando semen procedente de 2 centros de IA diferentes, con toros y protocolos de criopreservación diferentes y en distintas condiciones de manejo y alimentación. No obstante, los resultados obtenidos con eyaculados de toros Holstein, no necesariamente tienen que ser aplicables a todas las razas bovinas. De hecho, en semen porcino (Quintero-Moreno y col., 2004; Rivera y cols., 2005; 2006), de conejo (Quintero-Moreno y col., 2007) y de perro (Nuñez-Martínez y col., 2006 a,b) se han observado diferencias en el número y estructura de las subpoblaciones espermáticas identificadas en eyaculados de individuos de la misma especie pero de distintas razas. Por tanto al usar otras razas de toros, es posible que cambie el número de subpoblaciones y la frecuencia de distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones; aunque también es probable que dichos cambios se produzcan únicamente a nivel de la subpoblación 4, como hemos podido constatar en el experimento 2, al establecer las diferencias entre toros rubios y frisonos en los parámetros cinéticos que definen el movimiento de los espermatozoides rápidos.

El proceso de criopreservación (experimento 3) indujo cambios significativos en la frecuencia de distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones, y

sorprendentemente, dichos cambios fueron muy similares para los nueve toros utilizados. Aunque la diferente tasa de mortalidad espermática en las distintas subpoblaciones pudo haber influido en los cambios observados, fue evidente que el proceso de criopreservación modificó las características del movimiento de los espermatozoides que sobrevivieron a la congelación, con lo cuál algunos de ellos habrían sido asignados a una subpoblación diferente. Se puede hipotetizar una posible secuencia de progresión de los espermatozoides a través de las cuatro subpoblaciones. Los espermatozoides incluídos en la subpoblación 4, los más rápidos y progresivos, representaban el porcentaje mayoritario en eyaculados frescos; el patrón de movimiento de esta subpoblación espermática probablemente sea el más propicio para llevar a cabo la fecundación. Tras la criopreservación y durante la incubación postdescongelación, algunos de los espermatozoides de la subpoblación 4 podrían reducir su actividad flagelar, probablemente como consecuencia de daños subletales ocasionados por la congelación, y pasarían a formar parte de la subpoblación 1. Algunos de los espermatozoides de la subpoblación 1, constituida por células con movimiento relativamente lento pero progresivo, podrían perder la capacidad para controlar la permeabilidad selectiva de sus membranas y de esta forma experimentar una falsa hiperactivación (Yanagimachi, 1994), pasando a formar parte de la subpoblación 2. Finalmente, la subpoblación 3, constituida por espermatozoides no progresivos y de escasa motilidad, representarían un estadio final de degeneración espermática; a medida que las células de las otras tres subpoblaciones, y predominantemente de la subpoblación 2, se van deteriorando, se irían incluyendo en la subpoblación 3.

Los cambios (inducidos por la criopreservación) en la frecuencia de distribución de las distintas subpoblaciones fueron bastante similares para los nueve toros del estudio, y las diferencias entre individuos quedaron establecidas casi exclusivamente por el porcentaje de espermatozoides asignados a la subpoblación 4, tanto en semen fresco, tras la descongelación, o durante la incubación post-descongelación. Es interesante señalar que se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides incluídos en la subpoblación 4 en eyaculados frescos y el de dicha subpoblación en semen descongelado, tras 0 y 2 h de incubación post-descongelación. Ello indicó que los eyaculados que

contenían la mayor proporción de espermatozoides rápidos y progresivos fueron también los de mayor resistencia a la congelación y los que mostraron mayor longevidad post-descongelación. Resultados similares se encontraron también en eyaculados humanos (Davis y cols., 1995) y de perros (Nuñez-Martínez y cols., 2006a y b) y se ha sugerido que los espermatozoides que pertenecen a los clusters de mayor velocidad y con movimiento más progresivo pueden ser considerados los de mayor capacidad fecundante (Quintero-Moreno y cols., 2003; Cremades y cols., 2005; Nuñez-Martínez y cols., 2006). Si la capacidad fecundante de las dosis de semen congelado que se han utilizado en este estudio, se localizase exclusivamente en la subpoblación 4, entonces, a juzgar por nuestros resultados, únicamente alrededor del 20% de los espermatozoides presentes en cada dosis de inseminación tendría la capacidad de migrar hacia el oviducto. Alternativamente, es posible que algunos de los espermatozoides pertenecientes a la subpoblación 1, de velocidad más lenta pero con trayectoria progresiva, puedan también formar parte de la población “competente” seleccionada por el tracto genital femenino durante la fase de transporte espermático sostenido.

La subpoblación 4 fue también la que estableció las principales diferencias entre las tres temperaturas de descongelación (35°C/40 s, 50°C/15 s y 70°C/5 s) evaluadas en el experimento 4. Cuando el semen se descongeló a 35°C, al cabo de 2 h de incubación post-descongelación, el porcentaje de espermatozoides asignados a la subpoblación 4 disminuyó de forma significativa, sin embargo, esto no ocurrió cuando la descongelación se realizó a 50°C, o la disminución fue de menor entidad cuando se descongeló a 70°C. Esto indicó que la descongelación a 35°C indujo daños subletales más severos que a temperaturas más altas, y que descongelar a 50°C resultó menos perjudicial para los espermatozoides que a 70°C.

Algunos de los parámetros cinéticos que definían a las cuatro subpoblaciones variaron de forma significativa dependiendo del método de descongelación. Los espermatozoides incluidos en la subpoblación 4 mostraron un movimiento más rápido y activo cuando se descongelaron a 35°C que al descongelarlos a 50°C o a 70°C. Esta mayor actividad flagelar puede que haya causado un agotamiento más rápido de las células

espermáticas, y en parte, esto explicaría la mayor reducción de esta subpoblación tras 2 h de incubación post-descongelación.

A lo largo de la incubación post-descongelación, los parámetros cinéticos que definían a las cuatro subpoblaciones variaron significativamente, en general para indicar que la velocidad y progresividad de los espermatozoides de las distintas subpoblaciones había disminuido durante la incubación. La única excepción a esta norma fue cuando el semen se descongeló a 50°C: el porcentaje de espermatozoides asignados a la subpoblación 4 no sólo se mantuvo casi inalterado, sino que además los espermatozoides de esta subpoblación mostraron un movimiento más rápido y progresivo que antes de la incubación.

En definitiva, los resultados del experimento 4 confirmaron los hallazgos del estudio anterior, en el que se identificaron cuatro subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en semen bovino fresco y congelado. Los tres métodos de descongelación evaluados en este experimento produjeron resultados similares en términos de motilidad post-descongelación o integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Sin embargo, el estudio de las diferentes subpoblaciones espermáticas presentes en muestras de semen descongeladas a diferentes temperaturas, y especialmente, el estudio de la dinámica de esas subpoblaciones durante la incubación post-descongelación del semen, reveló la existencia de diferencias sutiles entre los tres métodos de descongelación. Cuando el semen se descongeló a las temperaturas más altas, la proporción de espermatozoides con movimiento rápido y progresivo fue mayor que cuando la descongelación fue a menor temperatura. Si esta pequeña diferencia podría afectar a la fertilidad *in vivo* del semen descongelado todavía no se sabe, pero lo que sí parece indicar es que la descongelación del semen a 35°C es más perjudicial que a 50°C o a 70°C.

VII. CONCLUSIONES

1.- Cuando el protocolo de criopreservación del semen bovino implicaba un periodo de equilibrado de 18 h a 4°C, el uso de un diluyente elaborado en base a yema de huevo como sustancia protectora de las membranas espermáticas frente al shock por frío, como es el Biladyl[®], proporcionó mejor supervivencia y longevidad espermática postdescongelación que el uso de diluyentes elaborados a partir de extractos de soja, como son el Andromed[®] o el Biociphos Plus[®].

2.- Los toros de raza Holstein mayores de 3 años produjeron mayor volumen de eyaculado que los Holstein jóvenes y que los Rubios Gallegos de ambos grupos de edad. Por el contrario, la concentración espermática fue mayor para la raza Rubia Gallega que para la Holstein, sin diferencias entre grupos de edad. El número total de espermatozoides en el eyaculado no dependió de la raza pero sí de la edad, siendo mayor en animales de más de 3 años.

3.- Los valores medios de los parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB y ALH) en muestras de semen fresco procedentes de toros de raza Holstein y Rubia Gallega fueron similares para ambas razas y no hubo diferencias entre toros mayores o menores de 3 años de edad.

4.- La subpoblación de espermatozoides clasificados como rápidos por el SCA2002[®], que incluía a todos los espermatozoides con una VCL > 110 µm/s, en toros Holstein describía un movimiento de mayor velocidad y linealidad que en toros de raza Rubia Gallega, independientemente de la edad de los toros. Sin embargo, el movimiento de los espermatozoides clasificados por el sistema como medios o lentos, fue similar para ambas razas y grupos de edad.

5.- El análisis de clusters multivariante permitió identificar la existencia de cuatro subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos, tanto en eyaculados frescos como en semen congelado: 1) espermatozoides con desplazamiento moderadamente lento y de trayectoria progresiva; 2) espermatozoides con gran velocidad

pero de trayectoria no progresiva; 3) espermatozoides con escasa motilidad y sin progresividad, y 4) espermatozoides muy rápidos y de gran progresividad.

6.- El proceso de criopreservación modificó significativamente la distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones, produciéndose una disminución de las subpoblaciones 2 y 4 y un incremento de la subpoblación 3.

7.- Las diferencias entre toros se manifestaron casi exclusivamente en base a la subpoblación de espermatozoides rápidos y progresivos, y la magnitud de esta subpoblación en eyaculados frescos se correlacionó positivamente con su resistencia a la criopreservación.

8.- Las tres temperaturas de descongelación evaluadas (35°C / 40 s; 50°C / 15 s; 70°C / 8 s) produjeron resultados similares en cuanto a la motilidad total y la viabilidad espermática postdescongelación. Sin embargo, el estudio de las diferentes subpoblaciones espermáticas durante la incubación post-descongelación reveló diferencias entre los tres métodos de descongelación, obteniéndose mayor proporción de espermatozoides rápidos y progresivos cuando el semen se descongeló a las temperaturas más elevadas.

VIII. RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue la aplicación de nuevas tecnologías (sistemas CASA y citometría de flujo) para valorar de forma objetiva el éxito de nuevos métodos de congelación y descongelación del semen, la utilidad de nuevos diluyentes o la presencia de subpoblaciones espermáticas con características de movimiento específicas, que reflejan la existencia de espermatozoides con diferentes patrones cinéticos en un mismo eyaculado o dosis seminal.

Para la realización de dicho trabajo se han efectuado 4 experimentos sobre distintos aspectos del protocolo de criopreservación de semen bovino de acuerdo al siguiente diseño experimental.

Inicialmente se realizó un estudio comparativo de los tres diluyentes más frecuentemente utilizados por los diferentes centros de inseminación artificial (Andromed®, Biociphos Plus® y Biladyl®), obteniendo los resultados más satisfactorios con el medio dilutor elaborado a base de yema de huevo. Este medio se utilizó como base de las siguientes experimentaciones.

A continuación se establecieron valores medios para una serie de parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático, obtenidos mediante un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer), en eyaculados de toros Holstein y de raza Rubia Gallega, y clasificados con calidad adecuada para la criopreservación. Los resultados obtenidos después del análisis cinético revelaron que en general los toros Holstein tenían un porcentaje de espermatozoides rápidos con mayor velocidad y de trayectoria más rectilínea que dicho porcentaje en toros rubios.

El tercer experimento consistió en determinar la existencia de diferentes subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de toros Holstein. Además, se determinó la frecuencia de distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones, y se evaluó el efecto de la criopreservación e incubación postdescongelación sobre la distribución de los espermatozoides dentro de las diferentes subpoblaciones. Los resultados mostraron que los eyaculados con la subpoblación de espermatozoides más rápidos y progresivos presentaban mayor resistencia a la criopreservación y manifestaban mayor supervivencia espermática después de cuatro horas de incubación a 37°C.

Por último, se evaluó el efecto de diferentes temperaturas de descongelación del semen bovino (37°C durante 40 s, 50°C durante 15 s, y 70°C durante 8 s) sobre la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides, y sobre la distribución espermática en distintas subpoblaciones con patrones de movimiento específicos. Los resultados han puesto de manifiesto que las tres temperaturas de descongelación evaluadas (35°C / 40s; 50°C / 15s; 70°C / 8s) produjeron resultados similares sobre la motilidad total y la viabilidad espermática postdescongelación. Sin embargo, el estudio de las diferentes subpoblaciones espermáticas durante el stress térmico postdescongelación, reveló diferencias entre las tres temperaturas, obteniéndose una mayor subpoblación de espermatozoides rápidos y progresivos cuando el semen se descongeló a las temperaturas más elevadas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aamdal, J., Andersen, K., 1968. Fast thawing of semen frozen in straws. *Zuchthygiene* 3, 22-24.
- Abaigar, T., Holt W.V., Harrison, R.A.P., Del Barrio G., 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60, 32-41.
- Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A.R., Holt, W.V., 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight; electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction*. 122, 265-273.
- Acott, T.S., Carr, D.W., 1984. Inhibition of bovine spermatozoa by cauda epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30, 926-935.
- Afzelius, B.A., 1959. Electron microscopy of the sperm tail. Results obtained with a new fixative. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 269.
- Aires, V.A., Hinsch, K.D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., Hinsch, E., 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60, 269-279.
- Aitken, R.J., Wang, Y.F., Liu, J., Best, F., Richardson, D.W., 1983. The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int. J. Androl.* 6, 180-193.
- Almquist, J.O., Wiggin, H.B., 1973a. Effect of different combinations of freezing and thawing rates upon survival of bull spermatozoa in U.S. plastic straws. *A.I. Digest* 21, 10-11.
- Almquist, J.O., Wiggin, H.B., 1973b. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. *A.I. Digest* 21, 12-13.

- Amann, R.P., Hammerstedt, R.H., 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.* 23, 647-656.
- Amann, R.P., Hay, S.R., Hammerstedt, R.H., 1982. Yield characteristics, motility and Camp content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol. Reprod.* 27, 723-733.
- Amann, R.P., 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 2 (10), 89-98.
- Amann, R.P., Seidel, G.E., Mortimer, R.G., 2000. Fertilizing potencial in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology.* 54 (9), 1499-515.
- Amann, R.P., Hammerstedt, R.H., 2002. Detection of differences in fertility. *J. Androl.* 23 (3), 317-325.
- Amelar, R.D., Dublin, L., Schoenfeld, C., 1980. Sperm motility. *Fertil. Steril.* 34, 197-213.
- Anchordoguy, T.J., Rudoph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1987. Modes of interaction of cryoprotectans with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology.* 24, 324-331.
- Anger, J., Ronot, X., Dadoune, J.P., 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J. Androl.* 10, 439-448.
- Anzar, M., Hassan, M.M., Graham, E.F., Deyo, R.C.M., Singh, G., 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology.* 2 (36), 307-317.
- Armitage, W.J., 1986. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiology.* 23, 116-125.
- Bailey, T., Monke, D., Hudson, R., Wolfe, D., Carson, R., Riddell, M., 1996. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *Theriogenology.* 46, 881-887.
- Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.* Iowa State University Press.

- Bedford, J.M., Calvin, H.I., 1974. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.*, 188, 137-156.
- Bedford, J.M., 1975. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis., en *Handbook of Physiology*, DW Hamilton and RO Greep (eds), Section 7, Endocrinology vol 5 Male Reproductive System, pp. 303-317, Am. Physiol. Soc. Washington DC.
- Becker, W.C., Senger, P.L., Aalseth, E.P., Marshall, C.E., 1977. Influence of glycerol levels, diluent and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. *J. Anim. Sci.* 44, 1067-1071.
- Berger, T., 1990. Pisum sativum agglutinin used as acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology*. 33, 689-695.
- Berndtson, W.E., Foote, R.H., 1969. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. *Cryobiology*. 5, 398-402.
- Berndtson, W.E., Foote, R.H., 1972. The freezability of spermatozoa after minimal pre-freezing exposure to glycerol or lactose. *Cryobiology*. 9, 57-60.
- Berndtson, W., Igboeli, G., Pickett, B., 1987. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young bulls. *J. Anim. Sci.* 64, 241-246.
- Bialy, G., Ludwick, T.M., Hess, E.A., Ely, F., 1957. Influence of lipoprotein on the freezing of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 40, 1189-1192.
- Bloom, E., 1977. Sperm morphology with reference to bull infertility. *First All-India Symp. Anim. Reprod.* pp: 61-81.
- Blandau, R.J., Rumery R.E., 1964. The relationship of swimming novements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. *Fert. Steril.* 15: 571-579.
- Boixo, J.C., 1996. Valoración Laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. *Inform. Vet.* pp: 33-37.
- Bousseau, S., Brillard, J.P., 1994. In vitro and in vivo results of fertility in cattle, following inseminations performed with semen diluted and frozen in a Diluent free of animal origin products (Biociphos Plus). *Proceedings 6th European AI vets Meeting*, Edinburgh, UK.

- Bousseau, S., Brillard, J.P., Marquant-Le Guienne, B., Guérin, B., Camus, A., Lechat, M., 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50, 699-706.
- Boyers, S.P., Davis R., Katz D.F., 1989. Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.* 12, 172-200.
- Bruemmer, J.H., Eddy, R.W., Duryea, W.J., 1963. Temperature control in the low temperature preservation of spermatozoa. *J. Cell. Comp. Physiol.* 62, 113-117.
- Burgos, M.H., Tovar, E.S., 1974. Sperm motility in the rat epididymis. *Fert. Steril.* 25, 985-991.
- Catena, M., Cabodevilla J., 1999. Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*. 1 (3), 18-31.
- Centola, G.M., Mattox, J.H., Burde, S., Leary, J.F., 1990. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single wavelength fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 27, 130-135.
- Chandler, J.E., Adkinson, R.W., Nebel, R.L., 1984. Thawing optimums for bovine spermatozoa processed by three methods and packaged in Continental and French straws. *J. Dairy Sci.* 67, 398-404.
- Cheryl, A.T., Garner, D.L., Dejarnette, J.M., Clifton, E.M., 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56, 991-998.
- Christensen, P., Stenvang, J.P., Godfrey, W., 2004. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian semen. *J. Androl.* 25 (2), 255-64.
- Christensen, P., Boelling, D., Pedersen, K.M., Korsgaard, I.R., Jensen, J., 2005. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and non return rate of dairy bulls. *J. Androl.* 26, 98-106.
- Colas, G., 1975. Effect of initial freezing temperature, addiction of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fert.* 42, 277-285.

- Cole, H.H., Cupps, P.T., 1984. Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 221-223.
- Concannon, P.W., Battista, M., 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. En Kirk, R. Current Veterinary Therapy. Small Animal Practice. Saunders Philadelphia, 1247-1259.
- Corteel, J.M., 1977. Production, storage and insemination of goat semen. Proc. Symposium Management of Reproduction in sheep and goats. Am. Soc. of Anim. Sci., 41-57.
- Coulter, G., Rounsaville, T., Foote, R.H., 1976. Heritability of testicular size and consistency in Holstein bulls. J. Anim. Sci. 43, 10-11.
- Coulter, G., Foote, R., 1979. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle. Theriogenology. 11, 297-311.
- Curtis, S.K., Amann, R.P., 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. J. Anim. Sci. 53(6), 1645-1657.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., 2005. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. J. Androl. 26, 610-618.
- Crissman, H.A., Steinkamp J.A., 1990. Cytochemical techniques for multivariate analysis of DNA and other cellular constituents. En: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelson, M.L. (eds), Flow cytometry and sorting, 2nd ed. Wiley-Liss, New York, pp. 227-247.
- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W., 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacting human sperm. Gamete Res. 15, 213-226.
- Cross, N.L., Meizel, S., 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol. Reprod. 41, 635-641.
- Cross, N.L., Watson, S.K., 1994. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. Theriogenology. 42, 89-98.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Aurel Wistram, C., 1987. Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. Biochem. J., 242, 1-10.

- Darin-Bennet, A., White, I.G., 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology* 14, 466-477.
- Davis, R.O., Katz, D.F., 1993. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 14, 385-394.
- Davis, R.O., Drobnis, E.Z., Overstreet, J.W., 1995. Applications of multivariate cluster, discriminant function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.* 63, 1051-1057.
- Davis, R.O., Siemers, R.J., 1995. Derivation and reliability of kinematics measures of sperm motion. *Reprod. Fertil Dev.* 7, 857-869.
- Decuadro, H., Camus, A., Guy, D., 2002. Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with non return rates: a preliminary study in France. 14th Meeting European A.I VETS. pp: 105-108.
- DeJarnette, J.M., Barnes, D.A., Marshall, C.E., 2000. Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristic of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology.* 53, 1225-1238.
- DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., 2005. Straw-thawing method interacts with sire and extender to influence sperm motility and conception rates of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 3868-3875.
- Deka, B.C., Rao, A.R., 1985. Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen Buck semen. *Ind. Veter. J.* 62, 414-417.
- Den Daas, N., 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 87-94.
- Dhami, A.J., Sahni, K.L., Mohan, G., 1992. Effect of various cooling rates (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos Taurus* and *Bos Bubalis* semen. *Theriogenology.* 38, 565-574.
- Doebbler, G.F., 1996. Cryoprotective compounds. Review and discussion of structure and function. *Cryobiology.* 3, 2-11.
- Elmore, R., Bierschwal, C., Youngquist, R., 1976. Scrotal circumference measurements in 764 beef bulls. *Theriogenology.* 6, 485-494.
- England, G.C.W., Plummer, J.M., 1993. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, 261-270.

- Ennen, B.D., Berndston, W.E., Mortimer, R.G., Pickett, B.W., 1976. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 0,25 ml. straws. *J. Anim. Sci.* 43, 651-656.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Redelman, D., Ahmad, K., 1989. Assessment of the viability and fertilizing potencial of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gamete Res.* 22, 355-368.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Johnson, L.A., Redelman, D., Ahmad, K., 1990. Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using new antibiotic combinations. *Theriogenology.* 33, 1211-1220.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Thomas, C.A., Downing, T.W., Marshall, C.E., 1993. Interrelationships among fluorometric analyser of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 39, 1009-1024.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 279-280.
- Fawcett, D.W., Porter, K.R., 1954. A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morphol.* 94, 221-281.
- Farrant, J., Lee, H., Walter, L.A., 1977. Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival cells. En: Elliot, K., Whelan, J. (Eds.) *The freezing of mammalian embryos. CIBA Foundation Symposium N° 52 (new series).* Elsevier. Amsterdam. pp 49-67.
- Farrell, P.B., Trouern-Trend, V., Foote, R.H., Douglas Hamilton, D., 1995. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil. Steril.* 64 (1), 208-10.
- Félix, P., 1966. Reproducción e inseminación artificial ganadera. Editorial Científico Médica. pp.234-235.
- Fiser, P.S., Fairfull, R.W., 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on the cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology.* 21, 542-551.

- Foote, R.H., 1972. Tris and other organic buffers for the conservation of semen of various species. En *Riproduzione Animale e fecondazione Artificiale*. Italian Society for the Advancement of Animal Science. Edizione Agricole. Bologna. 99-105.
- Foulkes, J.A., 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and the integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 49, 277-284.
- Fray, C.S., Hoffer, A.P., Fawcett, D.W., 1972. A re-examination of motility patterns of rat epididimal spermatozoa. *Anat. Rec.* 173, 301-307.
- Furman, J.W., Ball, L., Seidel, G.E., 1975. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. *J. Anim. Sci.* 40, 665.
- Gaddum, P., 1968. Sperm maturation in the male reproductive tract: Development of motility. *Anat. Rec.* 161, 471-482.
- Gagnon, C., 1985 Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 847-855.
- Garner, D.L., Gledhill, B.L., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson, D., Van dilla, M.A., Johnson, L.A., 1983. Quantification of the X and Y chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 28, 312-321.
- Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A., Pace, M.M., 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34, 127-138.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Allen, C.H., 1988. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology*. 30, 369-378.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* Vol. 53, 276-284.
- Garner, D.L., 1997. Ancillary tests of bull semen quality. *Bull Infertility. Veterinary clinics of north america: Food Animal Practice*. Vol. 13(2), 313-330.
- Garner, D.L., Cheryl, A.T., 1999. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 222-229.

- Gebauer, M.R., Pickett, B.W., Komarek, R.J., Gaunya, W.S., 1970. Motility of bovine spermatozoa extended in "defined" diluents. *J. Dairy Sci.* 53, 817-823.
- Gibbons, I.R., Grimstone, A.V., 1960. On flagellar structure in certain flagellates. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 697-715.
- Gil, J., Januskaukas, A., Haard, M.Ch., Haard M.G.M., Johannisson, A., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H., 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos Plus® and Triladyl®. *Reprod. Dom. Anim.* 35, 69-77.
- Gilbert, G.P., Alquist, J.O., 1978. Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3 ml. straws at room temperature. *J. Anim. Sci.* 46, 225-231.
- Gillian, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C., 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 63(2), 445-57.
- Glover, F.A., 1968. Physical method of measuring the mobility of bull sperm. *Nature*. 219, 1263.
- Goodrich, R.P., Handel, T.M., Baldeschwieler, J.D., 1988. Modification of lipid phase behaviour with membrane-bound cryoprotectants. *Biochim. Biophys. Acta*. 938, 143-154.
- Graham, E.F., Grabo, B.G., Brown, K.I., 1972. Effects of some zwitterion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. I. *Bull. J. Dairy Sci.* 55, 372-378.
- Graham, E.F., Grabo, B.G., Pace, M.M., 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J. Anim. Sci.* 47(2), 80-119.
- Graham, J.K., Kunze, E., Hammerstedt, R.H., 1990. Analysis of Sperm Cell Viability, acrosomal Integrity, and Mitochondrial Function using flow cytometry. *Biol. Reprod.* 43, 55-64.
- Graham, J.K., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 239-247.
- Gran, D.G., Dott, H.M., 1976. The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47 (2), 407-408.
- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C., Casey, P.J., 1996. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*. 46, 1205-1215.

- Hafez, E.S.E., 1984. Reproducción e inseminación artificial en animals. Nueva Editorial Interamericana. México, pp.170.
- Hammerstedt, R.H., Volonte, C., Racker, E., 1988. Motility, heat, and lactate production in ejaculated bovine sperm. *Ach. Biochem. Biophys.* 266, 111-123.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? *J. Androl.*, 11(1), 73-88.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343-352.
- Hempling, H.G., White, S., 1984. Permeability of cultures magakaryocytopoietic cells of the rat to dimethylsulfoxide. *Cryobiology.* 21, 133-143.
- Hinsch, E., Hinsch, K.D., Boehm, J.G., Schill, W.B., Müller-Schlösser, F., 1997a. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg yolk-free and egg yolk-containing extenders. *Reprod. Dom. Anim.* 32, 143-149.
- Hinsch, E., Ponce, A.A., Hägele, W., Hedrich, F., Müller-Schlösser, F., Schill, W.B., Hinsch, K.D., 1997b: A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. *Hum. Reprod.* 12, 1673-1681.
- Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Duchateau, L., 2007. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian Bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 153-161.
- Holt, W.V., Watson, P.F., Curry, M., Holt, C.H., 1994. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil. Steril.* 62(6),1277-1282.
- Holt, W.V., 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 17-24.
- Holt, W.V., Van Look, J.W., 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction.* 127, 527-535.

- Hoskins, D.D., Stephens, D.T., Hall, M.L., 1974. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 37, 131-133.
- Howard, T.H., Pace, M.M., 1998. Seminal evaluation and artificial insemination: Fertility and Infertility in Veterinary Practice. Eds: Laing, J.A., Morgan, W.J., Wagner, W.C., Bailliere Tindall. London. U.K., 39-51.
- Hunter, R.H.F., 1982. Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract and the eggs investments. En: Cole, D.J.A., Foxcroft, G.R., (eds) Control of pig reproduction. Butterworth Scientific, London, pp. 49-64.
- Irvine, D.S., 1995. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum. Reprod.* 10, 53-59.
- Januskauskas, A., Söderquist L., Haard, M.G., Haard, M.Ch., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., 1996. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of the Swedish Red and White AI bulls. *Acta vet. Scand.* 37, 461-470.
- Januskauskas, A., Žilinskas, H., 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika* 17 (39).
- Johnson, L., O'Connor, M.L., Chandler, P.T., Meacham, Y.N., Saacke, R.G., 1974. Optima of glycerol, tris and thaw rate in freezing ram semen. *J. Anim. Sci.* 39, 213.
- Johnson, L.A., Flook, J.P., Hawk, H.W., 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41, 199.
- Jones, R.C., Martín, I.A.C., 1965. Deep freezing ram spermatozoa: the effect of milk, yola-citrate and sintetic diluents containing sugar. *J. Reprod. Fert.* 10, 413-423.
- Jones, R.C., 1968. Survival of bull and ram spermatozoa in preparations from skim milk. *J. Dairy Sci.* 51, 1288-1294
- Jones, R.C., 1969a. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37° C, 5° C and -79°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 983-994.
- Jones, R.C., 1969b. Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep-frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 995-1004.
- Jones, R.C., 1971. Ultrastructure of mammalian spermatozoa: The effects of buffer concentration in fixatives for boar spermatozoa. *Micron.* 2, 350-362.

- Jones, R.C., Martín, I.A.C., 1973. The effects of dilution, egg yola and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 35, 311-320.
- Kampschmidt, R.F., Mayer, D.T., Herman, H.A., 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 36, 733-742.
- Katz, D.F., Dott, H.M., 1975. Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 45, 263.
- Katz, D.F., Overstreet, J.W., 1981. Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil. Steril.* 35, 188.
- Keeler, K.D., Mackenzie, N.M., Dresser, D.W., 1983. Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *J. Reprod. Fert.* 68, 205-212.
- Kjaestad, H., Ropstad, E., Berg, K.A., 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.* 34, 299-303.
- Krause, W., 1995. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Hum. Reprod.* 10, 60-66.
- Lanz, R.N., Pickett, B.W., Komarek, R.J., 1965. Effect of lipid additives on pre- and post-freeze survival of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 48, 1692-1697.
- Lapwood, K.R., Martín, I.C.A., 1972. Effects of some buffers and inorganic and organic sodium salts in synthetic diluents for the storage of ram spermatozoa at 37°C or 5°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 25, 367-378.
- Lardy, H.A., Phillips, P.H., 1939. Preservation of spermatozoa. *Proc. Am. Soc. Anim. Prod.* 32nd Ann. Meet. 1939, 219-221.
- Linck, R.W., 1979. Advances in the ultrastructural analysis of the sperm flagellar axoneme. En: *The Spermatozoan*. Fawcett, D.W., Bedford, J.M., Urban and Schwarzenberg, Baltimore and Munich. 99-115.
- Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C., Stewart, D.L., 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.* 47 (2), 283-291.
- Litvan, G.G., 1972. Mechanism of cryoinjury in biological systems. *Cryobiology.* 9, 182-191.

- Liu, Z., Foote, R.H., 1998. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *J. Dairy Sci.* 81, 1868-73.
- Madrid, N., Ott, R., Rao, D., Parret, D., Vanderwert, W., Willms, C., 1988. Scrotal circumference, seminal characteristics and testicular lesions of yearling Angus bulls. *Am. J. Vet. Res.* 49, 579-584.
- Mann, T., 1964. The biochemystre of semen and of the reproductive male tract. 2ed. Methuen, London.
- Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E., Desnoyers, L., 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50, 977.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Ménard, M., 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen´s egg yolk. *Biol. Reprod.* 67, 1250-1258.
- Martin, I.C.A., 1963. Effects of lecithin, egg yolk, fructose and period of storage at 5°C on bull spermatozoa deep-frozen to -79°C. *J. Reprod. Fert.* 6, 441-449.
- Martin, I.C.A., 1965. Influence of equilibration, freezing rate, method of dilution and diluent on the survival of deep frozen bull spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 18, 901-915.
- Mattioli, M., Barboni, B., Lucidi, P., Seren, E., 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology.* 45, 373-381.
- Maxwell, W.M.C., Welch, G.R, Johnson, L.A., 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Reprod. Fertil. Dev.* 8, 1165-1178.
- Mazur, P., 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science.* 168, 939-40.
- Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cell cooled at supraoptimal rates. *Criobiology.* 14, 251-272.
- Mazur, P., Cole, K.W., 1985. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology.* 22, 509-536.

- Mazur, P., Rigopoulos, N., 1983. Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. *Cryobiology*. 20, 274-289.
- Melrose, D.R., 1962. Artificial insemination in cattle. En: *The semen of animals and artificial insemination*. (ed. J.P. Maule). Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks. England. pp. 1-181.
- Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., Tesarik, J., 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 95, 755-763.
- Meryman, H.T., 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 8, 173-183.
- Meyer, R.A., Barth, A.D., 2001. Effect of acrosomal defects on fertility of bulls used in artificial insemination and natural breeding. *Can. Vet. J.* 42 (8), 630-4.
- Milovanov, V.K., 1938. The artificial insemination of farm animals. *Sel'khozgiz, Moscow*.
- Mortimer, R.G., Berndtson, W.E., Ennen, B.D., Pickett, B.W., 1976. Influence of glycerol concentration and freezing rate of bovine spermatozoa in continental straws. *J. Dairy Sci.* 59, 2134-2137.
- Mortimer, S.T., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update* 3, 403-439.
- Mortimer, S.T., 2000. CASA practical aspects. *J. Androl.* 21, 515-524.
- Müller-Schlösser, F., Aires, V., Hinsch, E., Hinsch, K.D., 2001. Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk free semen diluters for cryopreservation of bovine semen. 34. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung. p. 54.
- NAAb (National Association of Animal Breeders) Technical conference proceedings 1986. pp: 102.
- Nagase, H., 1968. Protective effects of polyols against freezing injury of bull spermatozoa. I. Protective effects of xylitol. VI Intern. Cong. Anim. Reprod. Artf. Insem. París. Vol. 2, 1103-1105.

- Nagase, H., Tomizuka, T., 1968. Protective effects of polyols against freezing injury of bull spermatozoa. II. Polyols effects in different freezing methods. VI Intern. Cong. Anim. Reprod. Artf. Insem. París. Vol. 2, 1107-1109.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E.K., Gadella, B.M., 2003. A Triple stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.* 68, 1828-1835.
- Nehring, H., Rothe, L., 2003. Insemination of cryopreserved bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders. Proceedings 15th European AI vets Meeting, Budapest (Hungary), 8-11 October 2003. Proceedings, Cattle Session, 14-23.
- Nolan, J.P., Graham, J.K., Hammerstedt, R.H., 1992. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 311-322.
- Nothling, J.O., Arndt, E.P., 1995. Fertility of two bulls with poor sperm morphology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 66 (2), 74-6.
- Nur, Z., Dogan, I., Soylu, M.K., Ak, K., 2003. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue Méd. Vét.* 154, 487-490.
- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006a. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 408-415.
- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006b. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation of cryoresistance. *J. Androl.* 27, 596-603.
- O'Connor, M.T., Amann, R.P., Saacke, R.G., 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J. Anim. Sci.* 53 (5), 1368-1376.
- Ohki, S., Doyle, D., Flanagan, T.D., Hui, S.W., Mayhew, E., 1988. Molecular mechanisms of membrane fusion. New York: Plenum.
- Pace, M.M., Graham, E.F., 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39, 1144-1149.

- Palencia, D.D., Garner, D.L., Hudig, D., Holcombe, D.W., Burner C.A., Redelman D., Fernández G.C.J., Abuelyaman A.S., Kam C.M., Powes J.C., 1996. Determinación of activable proacrosin/acrosin in bovine sperm using an irreversible isocoumarin serine proteasa inhibitor. *Biol. Reprod.* 55, 536-542.
- Parks, J.E., Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38, 209-222.
- Peña, A., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C., 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*. 52, 965-980.
- Phillips, P.H., 1939. Preservation of bull semen. *J. Biol. Chem.* 130, 415.
- Phillips, N. J.; Evans, G.; McGowan, M. R., 2004. Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Aust Vet J.* 82 (5), 309-310.
- Pickett, B.W., Back, D.G., 1973. Procedures for preparation, collection, evaluation and insemination of stallion semen. Ft. Collins, Col., Colorado State University, General Series 934, 501-531.
- Pickett, B.W., Berndtson, W.E., 1974. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review. *J. Dairy Sci.* 57, 1287-1301.
- Pickett, B.W., Berndtson, W.E., 1978. Principles and techniques of freezing spermatozoa. En: Salisbury G.W., VanDemark, N.L., Lodge J.R. (eds), *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of cattle*. WH Freeman and Company, San Francisco.C.A.pp.494-589.
- Pinkel, D., Garner, D.L., Gledhill, B.L., Lake, S., Stephenson, D., Johnson, L.A., 1985. Flow cytometric determination of the proportions of X and Y chromosome bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *J. Anim. Sci.* 60, 1303-1307.
- Pintado, B., De la Fuente, J., Roldan, E.R.S., 2000. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258 or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.* 118, 145-152.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and the dehydration at low temperatures. *Nature. London.* 164, 666.

- Polge, C., 1953. The storage of bull semen at low temperatures. *Vet. Rec.* 65, 557-559.
- Polge, C., Soltys, M.A., 1960. Protective action of some neutral solutes during the freezing of bull spermatozoa and trypanosomes. En: *Recent research in freezing and drying*. Eds. Parkes, A.S. y Smith, A.U., Blackwell, Oxford. 87-100.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59, 1973-1990.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2004. Regresión analítica and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 61, 673-690.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 312-319.
- Rao, K.V., 1987. *Role of cell surface in development*. Vol. 1, Boca Raton, FL.: C.R.C. Press.
- Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 56, 801-815.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Palomo, M.J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2005. Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology*. 64, 934-946.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2006. Effects of constant, 9 and 16-h Light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 386-393.
- Robbins, R.K., Gerber, L.E., Saacke, R.G., 1972. Influence of thaw rate on maintenance of the acrosomal cap. *J. Anim. Sci.* 35, 253 (abstract).
- Robbins, R.K., O'Connor, M.L., Chandler, P.T., Saacke, R.G., 1973. Freezing of bovine semen in "fresh straws". *J. Anim. Sci.* 37, 327 (abstract).

- Robbins, R.K., Saacke, R.G., Chandler, P.T., 1976. Influence of freeze rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 42, 145-154.
- Rodriguez, O.L., Brendtson, W.E., Ennen, B.D., Ticket, B.W., 1975. Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.* 41, 129-136.
- Rodriguez-Gil, J.E., 2006. Mammalian Sperm Energy Resources Management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod. Dom. Anim.* 41(2), 11-20.
- Rodríguez-Martínez, H., Larsson, B., Zhang, B.R., Söderquist, L., 1997. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 43, 1-11.
- Rodríguez-Martínez, H., 1999. Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. pp: 302-316.
- Rodríguez-Martínez, H., 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. Chenoweth P.J. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York. USA.
- Saacke, R.G., White, J.M., 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, pp: 22.
- Salisbury, G.W., VanDemark, N.L., Lodge, J.R., 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Principles and techniques of freezing spermatozoa. (2ed). Freeman and Company. San Francisco. pp. 494-554.
- Salomon, S., 1968. Deep-freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Aust. J. boil. Sci.* 21, 351-360.
- Salomon, S., 1970. The survival of ram spermatozoa following pellet freezing bellow -79°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23, 459-468.
- Sherman, J.K., 1962. Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice. *Anat. Rec.* 144, 171-189.
- Slavik, T., 1987. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. *J. Reprod. Fert.* 79, 99-103.

- Sukardi, S., Curry, M.R., Watson, P.F., 1997. Simultaneous detection of acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim. Reprod. Sci.* 46, 89-96.
- Thacker, D.L., Alquist, J.O., 1951. Milk and milk products as dilutors for bovine semen. *J. Anim. Sci.* 10, 1082.
- Thérien I., Moreau R., Manjunath P., 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59, 768-776.
- Thérien I., Moreau, R., Manjunath, P., 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 61, 590-598.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., Cormick, M.c., 1996. Immunomagnetic selection of acrosome-reacted bovine spermatozoa using anti-acrosin antibodies. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 373-378.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., Dejarnette, J.M., Marshall, C.E., 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58, 786-793.
- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F., 2002. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology.* 57, 1087-1094.
- Thun, R., Janett, F., Fuschini, E., Keo, S., 2005. Comparison of Andromed® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of buck semen. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 356. (abstract).
- Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., 1998. Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol. Reprod. Dev.* 50 (3), 328-33.
- Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., 1999. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform shaped bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 57 (1-2), 35-50.
- Thundathil, J., Meyer, R., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology.* 54 (6), 921-34.

- Thundathil, J., Palomino, J., Barth, A., Mapletoft, R., Barros, C., 2001. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented. *Anim. Reprod. Sci.* 67 (3-4), 231-43.
- Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R., 2002. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*. 58 (1), 87-102.
- Thurston, L.M., Watson, P., Mileham, A., Holt, W., 2001. Morphologically distinct sperm subpopulation defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22, 382-394.
- Turner, T.T., Giles, R.D., 1982. Sperm motility - inhibiting factor in rat epididymis. *Am J Physiol.* 242, 199-203 .
- Unal, M.B., Berndston, W.E., Pickett, B.W., 1978. Influence of sugars with glycerol on post-thaw motility of bovine spermatozoa in straws. *J. Dairy Sci.* 61, 83-89.
- Van Camp, S.D., 1997. Common causes of infertility in the bull. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13 (2), 203-31.
- Van Den Berg, L., Rose, D., 1959. Effects of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$. *Arch. Biochem. Biophys.* 81, 319-329.
- Van Den Berg, L., Soliman, F.S., 1969. Effect of glycerol and dimethyl sulphoxide on changes in composition and pH of buffer salt solutions during freezing. *Cryobiology*. 6, 93-97.
- Van Lieshout, J.A.H., 1995. Report on the AI qualivet group. *Proc. 7th European AI vets Meet. The Netherlands.* 1-40.
- Van Wagtenonk-de Leeuw A.M., Haring, R.M., Kaal-Lansbergen, L.M.T.E., den Daas J.H.G., 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*. 54, 57-67.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57, 149-179.

- Voglmayr, J.K., Chartier, D.M., Sawyer, R.F., 1983. Viability of ram testicular spermatozoa following cryopreservation in rete testis fluid. *Cryobiology*. 20, 421-431.
- Watson, P.F., Martin, I.C.A., 1973. The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5°C or -196°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 927-935.
- Watson, P.F., Martin, I.C.A., 1975a. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structure of frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 28, 153-159.
- Watson, P.F., 1975b. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J. Reprod. Fert.* 42, 105-111.
- Watson, P.F., 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *J. Thermal Biol.* 1, 137-141.
- Watson, P.F., 1979. The preservation of semen in mammals. En: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press. Vol. 1. pp. 283-350.
- Watson, P.F., 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lamming, G.E.(Ed.) *Marshall's Physiology of Reproduction*. 2: Reproduction in the male. Churchill Livingstone. (Ed). Edimburgo, 747-869.
- Way, A.L., Henault, M.A., Killiam, G.J., 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*. 43 (8), 1301-1316.
- White, I.G., 1993. Lipids and Ca²⁺ uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 639-658.
- Wiggin, H.B., Almquist, J.O., 1975. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *J. Dairy Sci.* 58, 416-419.
- Wilmot, I., Polge, C., 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. I. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. *Cryobiology*. 14, 471-478.

- Yanagimachi, R., 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. En: Fertilization and embryonic development in vitro. Ed.: Mastroianni, L., Biggers, J.D. Plenum Press, New York. pp. 81-182.
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D.(Eds), The Physiology of Reproduction. Raven Press Ltd, New York. pp. 189-317.

X. ARTÍCULOS

Post-thaw Survival and Longevity of Bull Spermatozoa Frozen with an Egg Yolk-based or Two Egg Yolk-free Extenders after an Equilibration Period of 18 h

R Muíño¹, M Fernández² and AI Peña¹

¹Unit of Reproduction and Obstetrics, Departament of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela;

²Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia, Xenética Fontao, Lugo, Spain

Contents

The aim of the present study was to determine the suitability of using two egg yolk-free commercial extenders, Andromed® and Biociphos Plus®, as compared with the Tris-egg yolk based diluent Biladyl®, for the cryopreservation of bull spermatozoa when the freezing protocol involved holding the extended semen at 4°C for 18 h before the freezing. Six ejaculates from each of 10 Holstein bulls were collected by using artificial vagina. The ejaculates were evaluated for volume, sperm concentration and motility, divided in to three equal volumes, and diluted, respectively, with the three extenders as specified above. Extended semen was equilibrated for 18 h at 4°C and frozen in 0.25-ml straws. After thawing, 100- μ l aliquots of semen were labelled with SYBR-14, PI and PE-PNA (Phycoerythrin-conjugated Peanut agglutinin) and analysed by flow cytometry at 0, 3, 6 and 9 h after incubation at 37°C. A General Linear Model procedure for repeated measures was used to determine the effects of extender, bull, replicate and the interaction between them, on sperm viability and acrosomal integrity. Semen samples frozen with Biladyl® showed higher ($p < 0.001$) sperm survival after 0 h (47.9%) and 9 h (30.3%) of incubation than those frozen with Andromed® (38.5% and 17.3%, after 0 and 9 h respectively) or Biociphos Plus® (34.9% and 21.6%, after 0 and 9 h respectively). The bull and replicate had significant effects ($p < 0.001$) on both sperm viability and acrosomal integrity, but the interactions between bull and extender and between replicate and extender were not significant. It was concluded that, when holding the semen overnight before freezing, the use of Biladyl® results in higher sperm survival and longevity than the use of Andromed® or Biociphos Plus®.

Introduction

The artificial insemination (AI) industry has been always interested in improving the quality of the frozen semen marketed. For that, protocols of semen dilution with different extenders and additives as well as the use of different cooling, freezing and thawing rates have been constantly reviewed over the last decades (Pickett and Berndtson 1978; Watson 1979, 1990, 1995; Holt 2000). Glycerol and several low-density lipoproteins from egg yolk and milk are routinely used for cryopreservation of bull semen. The main benefit of egg yolk, especially the low-density lipoprotein fraction, is that it adheres to sperm cell membranes during the freeze-thaw process and prevents the loss of membrane phospholipids by increasing the tolerance to the freezing process (Graham and Foote 1987; Parks and Graham 1992). In recent years, however, there has been a trend against the use of egg yolk or milk in cryoprotective media because of the hygienic risks associated with the use of animal prod-

ucts, the lack of quality standards, and the presence of steroid hormones, which may reduce the fertilizing capacity of spermatozoa. Furthermore, egg yolk and milk introduce a risk of microbial contamination, with the subsequent production of endotoxins capable of damaging the fertilizing capacity of spermatozoa (Bousseau et al. 1998). For all these reasons, a well-defined extender not originated from animal tissues would present a valuable contribution to the AI industry (Van Wagendonk-de Leeuw et al. 2000). Two of the first commercially available defined extenders with non-animal originating substitutes for egg yolk were Biociphos Plus® and Andromed®. The two extenders are derived from soybean extracts and have already been tested for bull semen cryopreservation by various research groups (Bousseau and Brillard 1994; Hinsch et al., 1997a; Müller-Schlösser et al. 2001).

Protocols for freezing bull semen include the slow cooling of the extended semen to 4–5°C followed by an equilibration period of several hours at low temperature before freezing. The equilibration period was once thought to be important for glycerol equilibration, but glycerol penetrates bull sperm rapidly, and it is believed that the equilibration period is more necessary for the sperm membranes to be adapted to low temperatures rather than for glycerol penetration. Most cryopreservation protocols for bull sperm establish an equilibration period of 3–4 h, thus, the semen has to be frozen on the same day of collection. However, several studies indicated that holding the semen for 18 h overnight before freezing resulted in increased fertility (reviewed by Pickett and Berndtson 1978). Such prolonged period of equilibration is very convenient for the working schedule in AI centres where a high number of bulls are collected each day, being more practical to freeze all the semen collected on the morning of the next day. Most of the studies including prolonged equilibration periods were done by using egg yolk or milk-based extenders (Martin and Emmens 1961; Martig and Almquist 1966; Foote and Kaproth 2002) but, to our knowledge, there are no reports on the freezing protocols using egg yolk-free extenders in combination with a prolonged equilibration period.

Fertility data presented in most publications have severe limitations when used for the validation of a diagnostic assay. The ideal fertility trial should be performed 'on the edge of the dose-response curve' because the effect of a compensable sperm trait can be masked by using a high number of sperm per insemin-

ation dose (Amann and Hammerstedt 2002). A large-scale low-dose insemination trial is a laborious and very expensive way to test new extenders. A simpler approach would be to use flow cytometry to screen the extenders for post-thaw sperm viability and longevity for a number of bulls and ejaculates, and then, an insemination trial could be carried out if the initial results are positive (Christensen et al. 2005). Flow cytometry makes it possible to analyse thousands of sperm per sample and achieve a much higher precision than is possible with a microscopic assessment or CASA systems (Christensen et al. 2005).

In the study presented here, the flow cytometric method described by Nagy et al. (2003) was used for a preliminary evaluation of the two egg yolk-free commercial extenders, Andromed® and Biociphos Plus®, for freezing bull spermatozoa by using an equilibration period of 18 h, in comparison with an egg yolk control extender (Biladyl®), based on post-thaw sperm plasma and acrosomal membrane integrity, examined by flow cytometry at 3-h intervals during 9 h of incubation at 37°C.

At the bovine AI Centre where this experiment was done, all the semen collected during the day is usually held overnight at 4°C and frozen the next morning, and the extender routinely used is the Tris-egg yolk-based Biladyl®. Because Biladyl® consists of two solutions, containing 0% and 14% glycerol, respectively, it is considered the extender of choice when holding semen overnight before freezing, as glycerol can be added at the end of the holding period so as to reduce the potential toxic effects on the sperm cells because of prolonged glycerol exposure.

Materials and Methods

Animals

For the present study, a total of 60 ejaculates were collected from 10 Holstein bulls (six ejaculates per bull), with ages between 2 and 4 years. The bulls were in regular AI service housed at the Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia, Xenética Fontao, Lugo (Spain). The 10 bulls were collected on the same experimental days, once a week, during six successive weeks.

Semen collection and freezing

Ejaculates were collected by using artificial vagina (inside temperature: 45°C) and evaluated for volume, sperm concentration by using a photometer (SDM 4; Minitüb, Tiefenbach, Germany), and motility by subjective visual assessment. The sperm motility was evaluated after semen dilution in Biladyl® solution A (as explained below). Only ejaculates with at least 85% motile spermatozoa were used for the study.

Each ejaculate was divided into three equal volumes to be processed for cryopreservation using, respectively, three commercial extenders: Biladyl® (Minitüb), Andromed® (Minitüb) and Biociphos Plus® (IMV, L'Aigle, France). Biladyl® was added in 2 steps: solution A (without glycerol) was added in a first step, at room temperature (20°C), to obtain a sperm concentration of

160×10^6 spz/ml, and the same volume of Biladyl® solution B (containing 14% glycerol) at 4°C was added in three fractions, at 20-min intervals, at the end of the equilibration period, about 1 h before freezing. Andromed® and Biociphos Plus® were added to the semen samples in one step, at room temperature, at a final sperm concentration of 80×10^6 spz/ml. After dilution, the three aliquots were left to equilibrate in a cooler at 4°C for 18 h, packaged in 0.25 ml French-straws, and frozen in liquid nitrogen vapours in a programmable freezer by following the IMV Digit-cool standard curve for bovine semen ($-5^\circ\text{C}/\text{min}$ from $+4^\circ\text{C}$ to -10°C ; $-40^\circ\text{C}/\text{min}$ from -10°C to -100°C and $-20^\circ\text{C}/\text{min}$ from -100°C to -140°C).

Thawing was done in a waterbath at 37°C for 20 s. For each extender, three straws were simultaneously thawed, their content was pooled in a 5 ml falcon tube and the thawed semen was incubated at 37°C in the dark for 9 h. After 0, 3, 6 and 9 h of incubation, subsamples of 100 μl were taken, diluted with 400 μl of prewarmed PBS (Gibco Laboratories, Gran Island, NY, USA) containing a triple combination of fluorophores (specified below), and analysed by flow cytometry (final sperm concentration: approximately 16×10^6 spz/ml).

Triple fluorescent staining for flow cytometry

The staining protocol followed the description of Nagy et al. (2003) with modifications. A working solution of SYBR-14 (Component A of live/dead Sperm viability Kit; Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA; L-7011), PI (Component B of live/dead Sperm viability Kit) and PE-PNA (Phycoerythrin-conjugated peanut agglutinin; Biomed Corp, Foster City, CA, USA; P44) in PBS was prepared just before use. SYBR-14 was added at final concentration of 100 nM, PI at 12 μM and PE-PNA at 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. To 100- μl aliquots of thawed semen, 400 μl of the fluorophore working solution was added, mixed and incubated at 37°C in the dark for 10 min before flow cytometric analysis.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry analysis was performed on a Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Miami, FL, USA). The stained cells were excited by an air-cooled, 15-mW argon ion laser operating at 488 nm. Each analysis consisted of a minimum of 100 000 events, which were quantified simultaneously for green, orange and red fluorescence. The side and forward light scatter parameters were gated, so that only spermatozoa were analysed for fluorescence. Green fluorescence (from SYBR-14) was collected in the FL1 sensor through a 550-nm dichroic long-pass filter and a 525-nm band-pass filter, orange fluorescence (from PE-PNA) was collected in the FL2 sensor through a 600-nm dichroic long-pass filter and a 575 band-pass filter, and red fluorescence (from PI) was collected in the FL3 sensor through a 645 nm dichroic long-pass filter and a 620-nm band-pass filter. Data were analysed by using the System II program (Coulter Corporation).

The triple fluorescent staining allowed to identify and quantify four sperm subpopulations: a subpopu-

lation of spermatozoa only stained by SYBR-14, corresponding to live cells with intact acrosomes; a subpopulation of spermatozoa stained by SYBR-14 and PE-PNA but not by PI, corresponding to live cells with damaged acrosomes; a third subpopulation of spermatozoa stained by PI and PE-PNA but not stained by SYBR-14, that corresponds to dead cells with disrupted acrosomes and a fourth subpopulation of spermatozoa only stained by PI, being dead cells with intact acrosomes.

Statistical analysis

Data were subjected to a general linear model of analysis of variance for repeated measures (SPSS 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) to determine the effects of extender, bull, replicate and interactions between them on the sperm plasma and acrosomal membrane integrity during post-thaw incubation. Differences were tested by Tukey's HSD test and significance was set at a $p < 0.05$ level.

Results

The three extenders compared had different effects on the integrity of bull sperm plasma and acrosomal membranes during 9 h of incubation *in vitro* at 37°C. Semen samples frozen with Biladyl® showed higher ($p < 0.001$) sperm survival and longevity than those frozen with any of the two egg yolk-free extenders. Proportions of live spermatozoa with intact acrosomes (positive SYBR-14 and negative PE-PNA fluorescence), for the three extenders used, are presented in Fig. 1. For semen samples frozen with Andromed®, sperm viability did not significantly vary during the first 3 h of incubation (38.5% and 38.9% at 0 and 3 h respectively), whereas for those frozen with Biladyl® or Biociphos Plus® the sperm viability was kept unchanged for 6 h (47.9% and 45.6% at 0 and 6 h, and 34.9% and 31.2% at 0 and 6 h, respectively for Biladyl® and Biociphos Plus®). Along the incubation period, the most important decrease in sperm viability, for the 3 extenders, occurred after 9 h of incubation (30.3%, 17.3% and 21.6% for Biladyl®, Andromed® and Biociphos Plus® respectively).

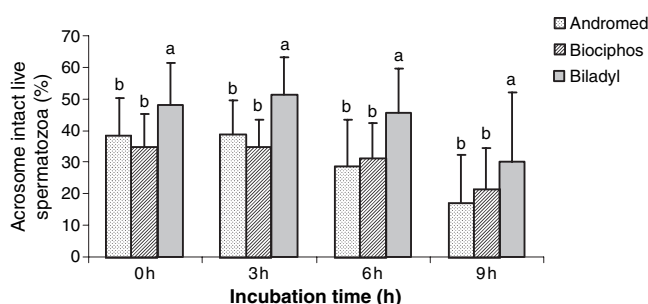


Fig. 1. Mean (\pm SD) percentages of live spermatozoa with intact acrosomes during post-thaw incubation at 37°C for bull semen samples frozen with Andromed® (dotted columns), Biociphos Plus® (striped columns) or Biladyl® (grey columns) after an equilibration period of 18 h at 4°C ($n = 60$); a, b indicate significant differences between extenders within evaluation time

The bull had a significant effect ($p < 0.001$) on the integrity of the sperm plasma and acrosomal membranes (Fig. 2a–d) but the interaction between bull and extender was not significant.

For all bulls except bull 9, a small increase (of between 1% and 5%) in the percentage of live spermatozoa with intact acrosomes was noticed after 3 h of incubation in the semen samples frozen with Biladyl®. For semen samples frozen with Andromed®, however, a similar increase in the sperm viability was observed in bulls 1, 3, 5, 6, 7 and 8; and for semen samples frozen with Biociphos Plus® only in bulls 1, 4, 8 and 9.

For the three extenders, a subpopulation of live spermatozoa with damaged acrosomes (positive SYBR-14 and PE-PNA fluorescence) was only evident after 6–9 h of incubation at 37°C (Fig. 3). The proportion of live spermatozoa with damaged acrosomes, after 9 h of incubation, was higher ($p < 0.001$) in semen samples frozen with Biladyl® ($9.5 \pm 12.0\%$) or with Andromed® ($8.7 \pm 11.1\%$) than in those frozen with Biociphos Plus® ($3.2 \pm 6.2\%$). Proportions of live spermatozoa with damaged acrosomes were significantly different ($p < 0.05$) for the different bulls (Fig. 4a–b), but the interaction between bull and extender was not significant.

Also there were significant differences ($p < 0.001$) between replicates (when including pooled data across bulls) in sperm viability (Fig. 5) and acrosomal integrity (data not shown), but there was no significant interaction between replicate and extender.

Discussion

The results of the present study strongly suggest that, if the semen is to be held at 4°C for 18 h before freezing, use of Biladyl® is preferable to any of the two egg yolk-free extenders studied.

Under the cryopreservation conditions of this study, post-thaw sperm survival and longevity were significantly higher in semen extended in Biladyl® than in Andromed® or Biociphos Plus®, and these results were consistent for nine of the 10 bulls used (Fig. 2a–d), and for the six replicates made with the 10 bulls (Fig. 5). The use of Biladyl® involved not only the presence of egg yolk as cryoprotective substance but also the stepwise addition of glycerol at the end of the holding time whereas using Andromed® or Biociphos Plus® glycerol was included at the first dilution of semen and hence it was not possible to isolate the two effects.

When freezing technology for bull spermatozoa was being developed, many aspects of the cryopreservation protocol, including glycerol concentration, rate and temperature of glycerol addition and extent of equilibration time, were carefully evaluated. The results of several fertility trials designed to determine the optimal glycerol equilibration period for bull semen (reviewed by Pickett and Berndtson 1978) established the beneficial effect of a period of several hours at 5°C before the freezing to obtain maximal fertility. Experiments were conducted by using different equilibration times at 5°C, both in the presence of and in the absence of glycerol, to determine the time period needed for glycerol to be equilibrated at both sides of the sperm plasma

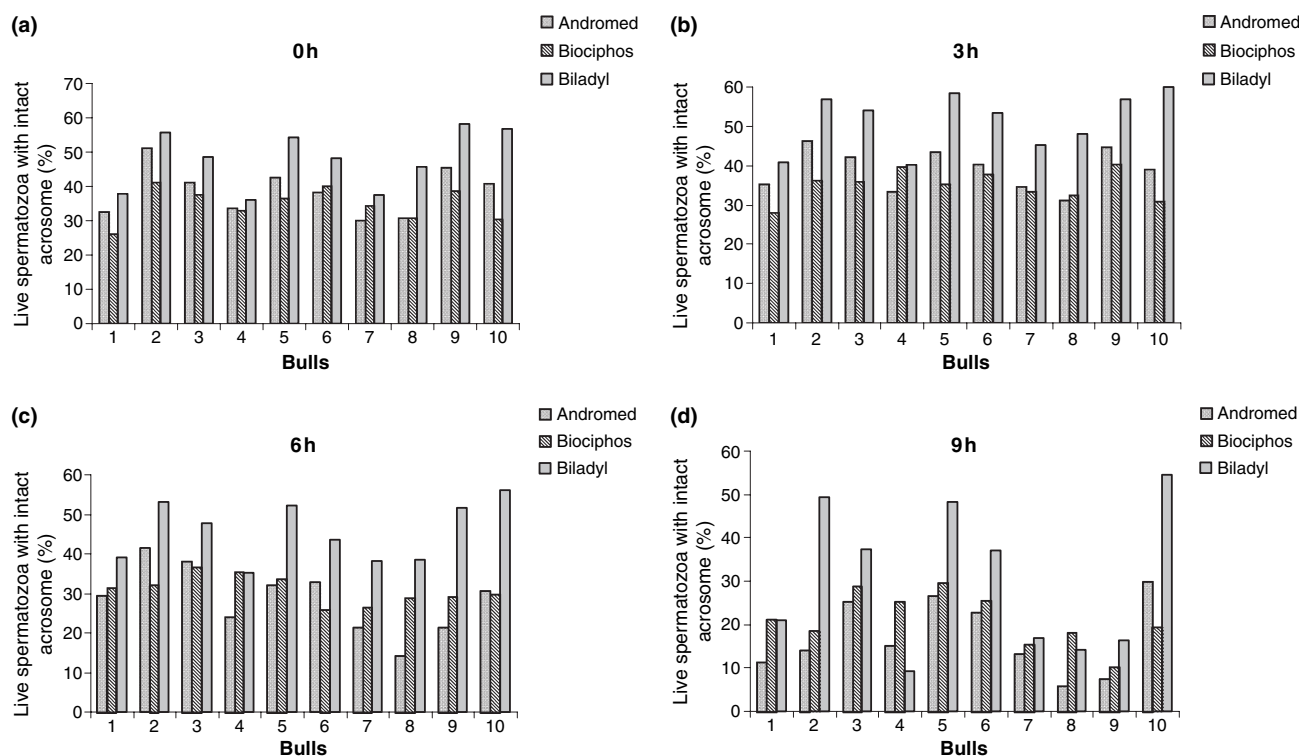


Fig. 2. (a–d) Mean percentages of live spermatozoa with intact acrosomes in semen samples from 10 Holstein bulls frozen with Andromed® (dotted columns), Biociphos Plus® (striped columns) or Biladyl® (grey columns) after an equilibration period of 18 h at 4°C, and evaluated after 0 (a), 3 (b), 6 (c) and 9 h (d) of post-thaw incubation at 37°C (n = 6)

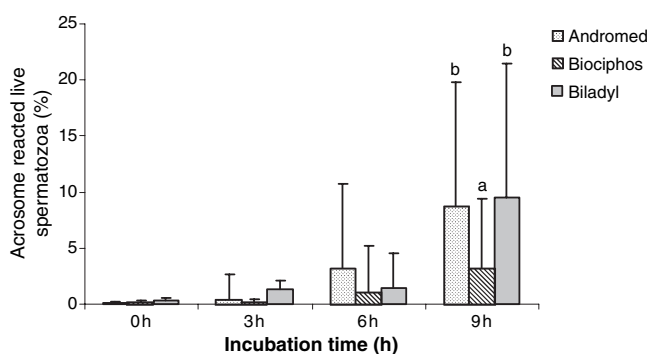


Fig. 3. Mean (\pm SD) percentages of live spermatozoa with damaged acrosomes during post-thaw incubation at 37°C for bull semen samples frozen with Andromed® (dotted columns), Biociphos Plus® (striped columns) or Biladyl® (grey columns) after an equilibration period of 18 h at 4°C (n = 60); a, b indicate significant differences between extenders within evaluation time

membrane. A number of experiments evidenced that glycerol penetration in bull spermatozoa takes no more than 2–5 min (Berndtson and Foote 1969, 1972) and that the equilibration period was more important for sperm membranes to be adapted to low temperatures rather than for glycerol penetration and equilibration. On the basis of the results obtained after a series of fertility trials (reviewed by Pickett and Berndtson 1978), a holding time of 4–18 h at 5°C before semen freezing was recommended, and glycerol could be added at any time during such period without affecting fertility. Under some circumstances, the stepwise addition of

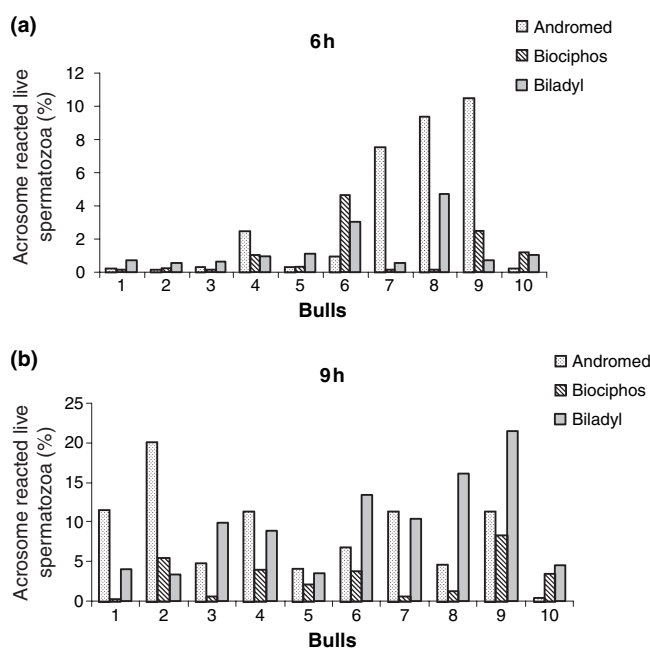


Fig. 4. (a–b) Mean percentages of live spermatozoa with damaged acrosomes in semen samples from 10 Holstein bulls frozen with Andromed® (dotted columns), Biociphos Plus® (striped columns) or Biladyl® (grey columns) after an equilibration period of 18 h at 4°C, and evaluated after 6 (a) and 9 h (b) of post-thaw incubation at 37°C (n = 6)

glycerol could enhance post-thaw motility, although the advantages had generally been small and might not be reflected in increased fertility. It was evident then, that

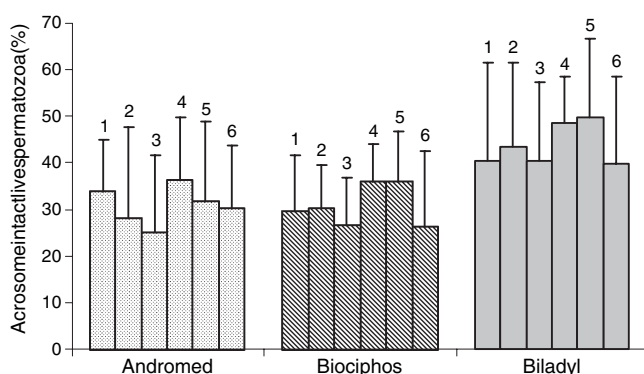


Fig. 5. Mean percentages of live spermatozoa with intact acrosomes after thawing (pooled data across post-thaw evaluation times) for bull semen samples frozen for six experimental days (pooled data across the 10 bulls) by using Andromed® (dotted columns), Biociphos Plus® (striped columns) or Biladyl® (grey columns) using an equilibration period of 18 h at 4°C. Numbers (1–6) over the columns indicate the experimental days

fertility of bull semen frozen in egg yolk or whole milk extenders was not significantly affected by the period of pre-freezing exposure to glycerol.

In a more recent study (Foote and Kaproth 2002), similar sperm motility post-thaw and 56-day non-return rates were obtained when bull semen was extended in whole milk-glycerol with or without fructose and frozen after 4 or 28 h of equilibration at 5°C.

Despite the findings of previous studies, given the known toxic effects of glycerol for spermatozoa (reviewed by Abdelhakeam 1988) and that sperm sensitivity to glycerol may differ between bulls, many AI organizations cautiously adopt the routine of stepwise addition of glycerol, particularly when holding semen overnight before freezing. Such was the case of the AI centre where this experiment was conducted, where Biladyl® is the diluent routinely used for the next day freezings and against which new extenders were required to be tested.

Previous studies on bull sperm cryopreservation comparing Biociphos Plus® or Andromed® with Tris-egg yolk based extenders, all of them using short equilibration periods of 2–5 h, reported conflicting results. Whereas Hinsch et al. (1997a,b) and Gil et al. (2000) did not find significant differences in post-thaw sperm motility, plasma and acrosomal membrane integrity, capacitation status or fertility of bull spermatozoa cryopreserved with Biociphos Plus® or with Triladyl®, others reported a reduction in the 56-day non-return rate (Van Wagtenonk-de Leeuw et al. 2000), lower post-thaw sperm motility, viability, morphology and osmotic resistance (Thun et al. 2002) or poorer sperm survival during post-thaw incubation (Christensen et al. 2005) when bull spermatozoa were extended in Biociphos Plus® compared with Tris-egg yolk extenders.

Concerning the use of Andromed®, Müller-Schlösser et al. (2001) found no significant differences in post-thaw motility, inducibility of acrosome reaction with ZP proteins or progesterone, or *in vivo* fertility of bull spermatozoa cryopreserved with Andromed® or a Tris-standard diluent. Aires et al. (2003) did not find

significant differences in *in vitro* sperm quality of bull semen frozen with Andromed® or a Tris-egg yolk extender, but the *in vivo* fertility of semen extended with Andromed® was significantly higher. Nehring and Rothe (2003) reported similar non-return rates for semen extended with Triladyl® or with Andromed® if using insemination doses of 15 million spermatozoa, but when the insemination dose was reduced to 5 million spermatozoa the decrease of non-return rates was almost twice higher for Andromed® than for Triladyl®. For the freezing of epididymal sperm from African buffalo (Herold et al. 2004, 2006), Triladyl® resulted in a higher post-thaw sperm motility and acrosomal integrity than Andromed®, and for both extenders, post-thaw sperm quality was not affected by varying the equilibration time in a range from 2 to 9 h.

As it can be seen, different research groups obtained different results; however, the advantages of one type of extender over the other have generally been small, and may be related with the different bull breeds (Gil et al. 2000; Thun et al. 2002) used by the different groups.

Although an effect of the different exposure to glycerol cannot be discarded, we believe that in the present study the beneficial effect of using Biladyl® was more probably due to a better cryoprotective action of egg yolk lipoproteins than of soybean-derived components during the prolonged holding time before freezing. A new mechanism for sperm protection by the low-density lipoprotein fraction of egg yolk has recently been proposed. Manjunath et al. (2002) have demonstrated that the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk has a very high capacity to bind to bovine seminal plasma (BSP) proteins; the binding is rapid, specific, saturable and stable even after freeze-thawing of semen. The BSP proteins are known to coat the sperm membranes at ejaculation (Manjunath et al. 1994) and to induce cholesterol and phospholipid efflux, and these effects are time- and concentration-dependent (Thérien et al. 1998, 1999). At longer exposure to BSP proteins, more cholesterol and phospholipids are removed. The removal of lipids, especially cholesterol, results in membrane destabilization and reduced resistance to cold shock and freezing (Darin-Bennet and White 1977; White 1993). The egg yolk lipoproteins are suggested to protect sperm membranes during cooling and freezing by sequestering most of the BSP proteins present in semen, thus, preventing their detrimental effects on sperm membranes (Manjunath et al. 2002). In the present study, during the prolonged storage of semen before freezing, the egg yolk low-density lipoproteins might have prevented or reduced the detrimental effects of BSP proteins on sperm membranes, whereas the soybean-derived phospholipids might not have had the capacity to reduce such negative effects.

Anyway, the results of the present study have indicated that when freezing bull spermatozoa the next day after collection, the use of the egg yolk-based extender, Biladyl®, results in higher sperm survival and longevity than the soybean-based extenders Andromed® and Biociphos Plus®.

Acknowledgements

This study was supported by the Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia, Xenética Fontao SA.

References

- Abdelhakeam A, 1988. Studies on Freezing Ram Semen in Absence of Glycerol. PhD Thesis, University of Minnesota, Minnesota.
- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E, 2003: In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* **60**, 269–279.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 2002: Detection of differences in fertility. *J Androl* **23**, 317–325.
- Berndtson WE, Foote RH, 1969: The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. *Cryobiology* **5**, 398–402.
- Berndtson WE, Foote RH, 1972: The freezability of spermatozoa after minimal pre-freezing exposure to glycerol or lactose. *Cryobiology* **9**, 57–60.
- Bousseau S, Brillard JP, 1994: In vitro and in vivo Results of Fertility in Cattle, following Inseminations Performed with Semen Diluted and Frozen in a Diluent Free of Animal Origin Products (Biociphos Plus). Proceedings 6th European AI vets Meeting, Edinburgh, UK.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guenne B, Guérin B, Camus A, Lechat M, 1998: Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* **50**, 699–706.
- Christensen P, Boelling D, Pedersen KM, Korsgaard IR, Jensen J, 2005: Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and non return rate of dairy bulls. *J Androl* **26**, 98–106.
- Darin-Bennet A, White IG, 1977: Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology* **14**, 466–477.
- Foote RH, Kaproth MT, 2002: Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *J Dairy Sci* **85**, 453–456.
- Gil J, Januskaukas A, Haard MCh, Haard MGM, Johannisson A, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H, 2000: Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos Plus® and Triladyl®. *Reprod Dom Anim* **35**, 69–77.
- Graham JK, Foote RH, 1987: Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* **24**, 42–52.
- Herold FC, Aurich JE, Gerber D, 2004: Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* **61**, 715–724.
- Herold FC, de Haas K, Colenbrander B, Gerber D, 2006: Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology* **66**, 1123–1130.
- Hinsch E, Hinsch KD, Boehm JG, Schill WB, Müller-Schlösser F, 1997a: Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg yolk-free and egg yolk-containing extenders. *Reprod Dom Anim* **32**, 143–149.
- Hinsch E, Ponce AA, Hägele W, Hedrich F, Müller-Schlösser F, Schill WB, Hinsch KD, 1997b: A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. *Hum Reprod* **12**, 1673–1681.
- Holt WV, 2000: Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* **62**, 3–22.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L, 1994: Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* **50**, 977.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M, 2002: Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* **67**, 1250–1258.
- Martig RC, Almquist JO, 1966: Effect of glycerol equilibration time on fertility of bull spermatozoa frozen in homogenized milk-fructose diluent. *AI Digest* **14**, 8–9.
- Martin ICA, Emmens CW, 1961: Effects of time of equilibration and addition of fructose on the survival of bull spermatozoa deep-frozen to –79°C. *J Reprod Fertil* **2**, 404–410.
- Müller-Schlösser F, Aires V, Hinsch E, Hinsch KD, 2001: Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk free semen diluters for cryopreservation of bovine semen. 34. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, p.54.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM, 2003: A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod* **68**, 1828–1835.
- Nehring H, Rothe L, 2003: Insemination of Cryopreserved Bull Semen Portions with Reduced Sperm Numbers after Dilution with Two Egg Yolk-free Extenders. Proceedings 15th European AI vets Meeting, Budapest (Hungary), 8–11 October 2003. Proceedings, Cattle Session, 14–23.
- Parks JE, Graham JK, 1992: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* **38**, 209–222.
- Pickett BW, Berndtson WE, 1978: Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR (eds), *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. WH Freeman and Company, San Francisco, CA, pp. 494–589.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P, 1998: Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* **59**, 768–776.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P, 1999: Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* **61**, 590–598.
- Thun R, Hurtado M, Janett F, 2002: Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* **57**, 1087–1094.
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LMTE, den Daas JHG, 2000: Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* **54**, 57–67.
- Watson PF, 1979: The preservation of semen in mammals. In: Finn CA (ed.), *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Clarendon Press, Oxford, pp. 283–350.
- Watson PF, 1990: Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G (ed.) *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, pp. 747–869.
- Watson PF, 1995: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* **7**, 871–891.

White IG, 1993: Lipids and Ca^{2+} uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* **5**, 639–658.

Author's address (for correspondence): R Muiño, Unit of Reproduction and Obstetrics, Departament of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain. E-mail: anaipena@lugo.usc.es

Submitted: 12.06.2006

Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toros de raza frisona y rubia gallega

R. Muiño*, M. Fernández**, A.I. Peña*

* Departamento de Patología Animal. Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.España. anaipena@lugo.usc.es

** Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia.Xenética Fontao, S.A., Fontao-Esperante, Apdo 128. 27080 Lugo (España).

Resumen

En este trabajo se utilizaron 119 eyaculados procedentes de toros de raza Rubia Gallega y Frisona. La calidad del semen inicialmente se valoró en base a sus características macroscópicas, motilidad masal, motilidad individual y concentración espermática. Tras la evaluación, los eyaculados calificados como "no aptos para criopreservación" se descartaron, y los eyaculados seleccionados para congelación fueron analizados con un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). El objetivo del trabajo fue establecer valores medios, en semen fresco con calidad adecuada para la criopreservación, para una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático. Los valores obtenidos podrían ser utilizados como parámetros de referencia por laboratorios que dispongan de un equipo Sperm Class Analyzer (software SCA®2002 Movilidad, Microptic S.L., Barcelona, España).

Palabras clave: análisis computerizado, raza, semen fresco.

Summary

Motion characteristics in bovine ejaculates from holstein and rubia gallega bulls

For this study, 119 ejaculates from Holstein and Rubia Gallega bulls were used. The semen quality was initially evaluated based on its macroscopic characteristics, collective motility, individual motility and sperm concentration. After evaluation, the ejaculates scored as "not adequate for cryopreservation" were discarded whereas those selected for cryopreservation were analysed by using a CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system. The aim of the present study was to establish mean values for some motility descriptors observed in bovine fresh semen with optimal quality for cryopreservation. The values obtained in this study could be used as a reference by other institutions using a Sperm Class Analyzer equipment (software SCA®2002 Movilidad, Microptic S.L., Barcelona, España).

Key words: computer analysis, race, fresh semen.

Introducción

La motilidad es sólo uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar a un ovocito, sin embargo, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad

de un eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado. Para que la migración espermática a través del tracto genital de la hembra ocurra normalmente, y sobre todo para el establecimiento de un reservorio espermático en el oviducto, los espermatozoides han tener movimiento activo; pero

además, la motilidad es también una manifestación de integridad estructural y de competencia funcional del espermatozoide.

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, este es un método simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke and White, 1972; Linford et al., 1976). Estos inconvenientes motivaron numerosos esfuerzos por parte de los investigadores para intentar eliminar la subjetividad inherente al examen microscópico de la motilidad (Glover, 1968; Katz and Dott, 1975; Amann and Hammerstedt, 1980; Katz and Overstreet, 1981; O'Connor et al., 1981), fruto de los cuales se desarrollaron los sistemas computerizados para el análisis de la motilidad espermática, también conocidos como sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos objetivos de las células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar et al., 1991). Pero además, permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento (Davis et al., 1995; Holt, 1996; Abaigar et al., 1999) que coexisten en la misma muestra de semen, lo cuál es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que una muestra de semen es una población heterogénea de espermatozoides.

A pesar de su uso generalizado en laboratorios de investigación y centros de I.A (inseminación artificial), no existe una estandarización de los equipos ni de los procedimientos empleados en los análisis (Verstegen et al., 2002). Cada laboratorio utiliza un sistema CASA diferente, con distintas especificaciones técnicas y en diferentes condiciones de trabajo (distintos medios de dilución, temperaturas, etc), lo que provoca que los resultados facilitados por los distintos centros sean muy dispares, y no sea posible comparar directamente los datos de los distintos laboratorios (Davis et al., 1993; Tardif et al., 1997).

El objetivo del presente estudio, por tanto, fue:

a) establecer unos valores medios para una serie de parámetros cinéticos obtenidos mediante un sistema CASA (en unas condiciones de trabajo definidas) para el semen fresco bovino, a partir de los resultados obtenidos tras el análisis de eyaculados bovinos previamente calificados, mediante evaluación subjetiva convencional, como de calidad "buena" o "muy buena" y "aptos para la congelación".

b) evaluar posibles influencias de la raza y/o de la edad sobre los parámetros descriptores de la motilidad espermática, mediante la comparación de los resultados obtenidos a partir del análisis de eyaculados de toros de raza Frisona y Rubia Gallega, y en ambas razas, de toros mayores y menores de 3 años.

Material y métodos

Animales

Para este estudio se utilizaron 119 toros, 61 de raza Rubia Gallega y 58 de raza Frisona, de edades comprendidas entre 15 meses y

13 años. Todos los sementales se encontraban alojados en las instalaciones del Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia XENÉTICA FONTAO, S.A. (Fontao, Esperante, Lugo). Comenzaron su etapa como reproductores a los 15 meses de edad, estaban clasificados como 'aptos para la reproducción' y libres de toda enfermedad infecto-contagiosa.

Obtención y evaluación de los eyaculados

La extracción del semen se realizó mediante el uso de vagina artificial, y de cada toro se obtuvieron dos eyaculados, con un intervalo de unos 20 min entre los dos saltos. Tras la obtención del semen, se realizó una primera valoración de la calidad seminal atendiendo a las siguientes características:

- color: normalmente entre blanco y amarillo, dependiendo de la presencia de β -carotenos.
- fluidez: se clasificó en denso, fluido o acuoso. La mayoría de las muestras presentaban un aspecto denso o fluido. Las de aspecto acuoso se descartaron.
- volumen: determinado por lectura directa en tubos graduados de 10 ml. Se calculó el volumen medio de los dos saltos.
- motilidad en masa: se puntuaron en una escala de 0 a 5. Los eyaculados con motilidad masal inferior a 3 se desecharon. Se calculó la motilidad media para los dos saltos.
- concentración espermática: determinada por medio de un espectrofotómetro calibrado (Photometer SDM 4, Minitüb, Tiefenbach, Germany). Se calculó la concentración media para los dos saltos.

Una vez determinados el volumen y la concentración, se mezcló el semen procedente de ambos saltos y se diluyó con Biociphos (IMV®, L'aigle, France) hasta una concentración de 100 millones/ml. Tras la dilución del

semen se evaluó subjetivamente la motilidad espermática individual y aquellas muestras con motilidad inferior al 60% se desecharon. Las muestras con un porcentaje de espermatozoides móviles entre el 60 y el 80% se consideraron de calidad 'buena' y si el porcentaje de motilidad era superior al 85% se consideraron de calidad 'muy buena'. Este criterio se utilizó con el fin de no congelar la mezcla de eyaculados con una motilidad subjetiva inferior al 60%, por tanto, al descartarlos de la congelación tampoco se analizaron con el CASA.

Evaluación de la motilidad espermática con un sistema CASA

Para el análisis objetivo de la motilidad, tomamos una gota de 5 μ l de semen diluido previamente y lo diluimos aun más utilizando una tasa de dilución 1:5 (1 volumen de semen diluido + 4 volúmenes de Biociphos) con el fin de reducir la concentración hasta 20 millones/ml, para facilitar el análisis de la muestra con el analizador de imagen. Otros 5 μ l de semen diluidos a esta nueva concentración se depositaron entre un porta y un cubre y se evaluaron 3 campos de microscopio, seleccionados de la parte superior, media e inferior del portaobjetos, analizando aproximadamente un total de 600 espermatozoides por muestra. Se utilizó un microscopio de contraste de fases (NIKON E-600, Tokyo, Japan), con Ph1 positivo, objetivo 10 x y platina a 37 °C. Las imágenes analógicas de los espermatozoides fueron digitalizadas y analizadas utilizando el software SCA®2002 Movilidad (Microptic S.L., Barcelona, España). El patrón de análisis del SCA 2002® predeterminado para la captura de las imágenes incluía los siguientes datos: número de imágenes capturadas por segundo: 25; velocidad mínima para espermatozoides lentos: 20 μ m/s; velocidad máxima para espermatozoides lentos: 60 μ m/s; velo-

cidad máxima para espermatozoides medios 110 $\mu\text{m/s}$; conectividad (distancia máxima entre dos objetos de dos imágenes sucesivas para que sea considerado el mismo objeto): 15 μm ; número mínimo de imágenes para calcular ALH: 5.

Parámetros analizados

– Parámetros de velocidad:

- Velocidad curvilínea (VCL): es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria en función del tiempo.
 - Velocidad rectilínea (VSL): es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.
 - Velocidad media (VAP): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media por unidad de tiempo.
 - Índice de linealidad de la trayectoria curvilínea (LIN): es la relación porcentual entre VSL y VCL.
 - Índice de rectitud (STR): es la relación porcentual entre VSL y VAP.
 - Índice de oscilación (WOB): es la relación porcentual entre VAP y VCL.
- ##### – Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:
- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH): es el desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
 - Frecuencia de batido (BCF): es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

En función de su VCL los espermatozoides se clasifican en estáticos ($\text{VCL} < 20 \mu\text{m/s}$), móviles no progresivos y móviles progresi-

vos; y dentro de los móviles, en rápidos ($\text{VCL} > 110 \mu\text{m/s}$), medios (VCL entre 60 y 110 $\mu\text{m/s}$) y lentos (VCL entre 20 y 60 $\mu\text{m/s}$).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un GLM (Modelo Lineal General) utilizando el programa estadístico SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), en el que las variables dependientes (volumen, concentración espermática, porcentajes de motilidad y parámetros descriptores del movimiento) se consideraron en función de dos variables independientes: la raza (Rubia Gallega o Frisona) y la edad (animales mayores o menores de 3 años). Las diferencias entre razas y/o grupos de edad se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

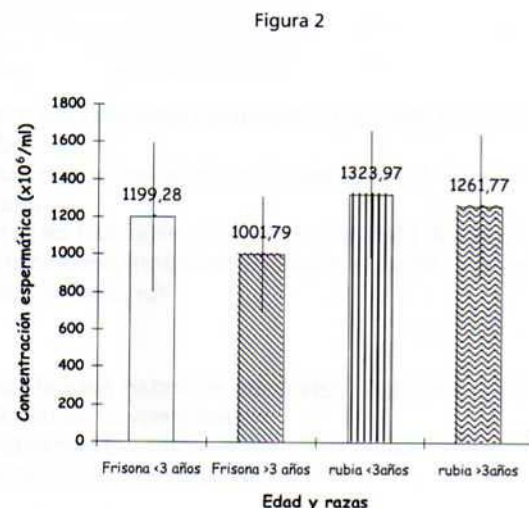
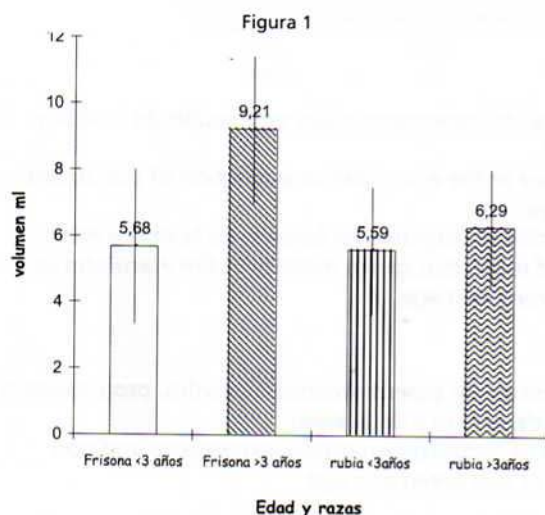
Resultados

Las medias (\pm desviaciones estándar) para el volumen del eyaculado, la concentración espermática, el número total de espermatozoides y el porcentaje de motilidad subjetiva se presentan en las figuras 1-4. La raza, la edad o la interacción entre ambas, tuvieron efectos significativos sobre los cuatro parámetros evaluados. Los toros de raza Frisona mayores de 3 años produjeron mayor volumen de semen que los frisonos jóvenes, y que los toros rubios de ambos grupos de edad. En la raza Rubia Gallega no se observaron diferencias en el volumen del eyaculado entre sementales mayores y menores de 3 años. Por el contrario, la concentración espermática media fue mayor para la raza Rubia que para la Frisona, sin observarse diferencias significativas entre grupos de edad. Mediante valoración subjetiva del eyaculado también se apreció una mayor densidad en los eyaculados de los toros de raza rubia gallega que en los de raza Friso-

na (resultados no mostrados). El número total de espermatozoides por eyaculado no dependió de la raza pero sí de la edad, siendo superior en animales mayores de 3 años. La motilidad espermática, valorada por estimación subjetiva, resultó ser mayor en toros rubios que en frisonos de más de 3 años, pero entre los jóvenes de ambas razas no se observaron diferencias (figura 4).

Las medias (\pm desviaciones estándar) de los parámetros descriptores de la motilidad obtenidos mediante el sistema CASA se presentan en las tablas 1-9. Los porcentajes de espermatozoides móviles, progresivos y no progresivos (tabla 1), así como los de espermatozoides rápidos y medios (tabla 2) no variaron con la raza ni con la edad de los

toros, pero se observó mayor ($P < 0.01$) porcentaje de espermatozoides lentos en los toros frisonos que en los rubios (12.67 ± 4.22 % vs. 10.38 ± 3.65 %). Con respecto a los parámetros de velocidad (tablas 3-8) o de angularidad y oscilación de la cabeza espermática (tabla 9), se observó que la raza ejercía un efecto significativo sobre alguno de ellos (tabla 10), pero no había diferencias entre los dos grupos de edad. En general se observó que en toros frisonos la subpoblación de espermatozoides clasificados como rápidos describía un movimiento de mayor velocidad y de trayectoria más rectilínea (mayor VSL, VAP, LIN, WOB y menor ALH) que dicha subpoblación espermática en eyaculados de toros rubios.



Significación (valor de P) de los efectos incluidos en el GLM sobre algunas de las características del eyaculado.

Variables dependientes	Variables independientes		
	raza	edad	raza * edad
Volumen	0.000	0.000	0.000
Concentración	0.004	n.s	n.s

Figura 1. Medias (\pm desviación estándar) del volumen en función de la raza y edad.

Figure 1. Mean (\pm standard deviation) ejaculate volumes as a function of bull breed and age.

Figura 2. Medias (\pm desviación estándar) de la concentración de espermatozoides en función de la raza y edad.

Figure 2. Mean (\pm standard deviation) sperm concentration in the ejaculates as a function of bull breed and age.

Figura 3

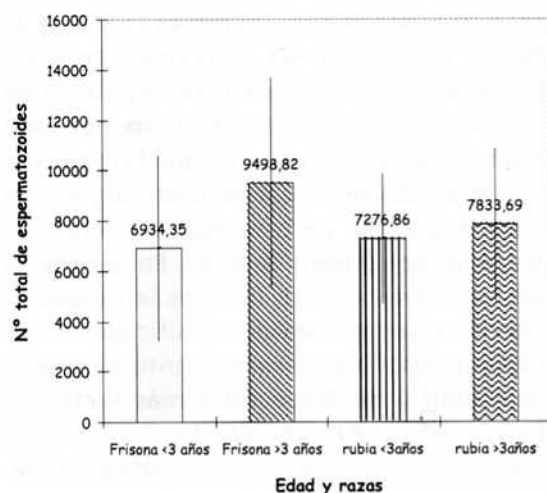
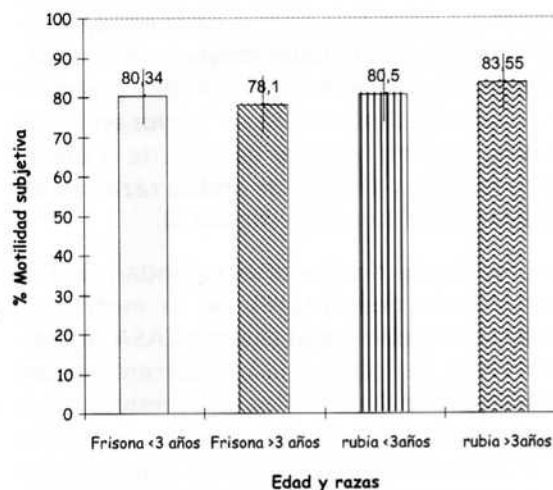


Figura 4



Significación (valor de P) de los efectos incluidos en el GLM sobre algunas de las características del eyaculado.

Variables dependientes	Variables independientes		
	raza	edad	raza * edad
Nº total de espermatozoides	n.s	0.014	n.s
% Motilidad subjetiva	0.030	n.s	0.040

Figura 3. Medias (\pm desviación estándar) del nº total de espermatozoides en función de la raza y edad.

Figure 3. Mean (\pm standard deviation) sperm number in the ejaculates as a function of bull breed and age.

Figura 4. Medias (\pm desviación estándar) de la motilidad subjetiva en función de la raza y edad.

Figure 4. Mean (\pm standard deviation) percentage of subjective sperm motility in the ejaculates as a function of bull breed and age.

Tabla 1. Medias (\pm desviación estándar) para el porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos o no progresivos, en función de la raza y de la edad

Table 1. Mean (\pm standard deviation) percentages of motile spermatozoa, progressive and non progressive, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		Motilidad total (%)	Estáticos (%)	Móviles progresivos (%)	Móviles no progresivos (%)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	91.04 \pm 2.98	8.96 \pm 2.98	58.59 \pm 5.64	32.45 \pm 4.77
	>3	29	Media (\pm DE)	90.79 \pm 4.20	9.21 \pm 4.20	57.28 \pm 4.59	33.51 \pm 5.48
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	89.85 \pm 4.14	10.15 \pm 4.14	57.60 \pm 5.33	32.25 \pm 5.24
	>3	31	Media (\pm DE)	91.52 \pm 4.24	8.48 \pm 4.24	59.35 \pm 5.47	32.18 \pm 5.02

Tabla 2. Medias (\pm desviación estándar) para el porcentaje de espermatozoides rápidos (VCL >110 $\mu\text{m/s}$), medios (VCL entre 60 y 110 $\mu\text{m/s}$) y lentos (VCL entre 20 y 60 $\mu\text{m/s}$), en función de la raza y de la edad

Table 2. Mean (\pm standard deviation) percentages of rapid (VCL >110 $\mu\text{m/s}$), medium (VCL between 60 and 110 $\mu\text{m/s}$) and slow spermatozoa (VCL between 20 and 60 $\mu\text{m/s}$) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		Rápidos (%)	Medios (%)	Lentos (%)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	55.91 \pm 12.19	23.38 \pm 7.79	11.74 \pm 4.25
	>3	29	Media (\pm DE)	50.89 \pm 14.27	27.23 \pm 12.65	12.67 \pm 4.22
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	54.98 \pm 12.07	24.59 \pm 8.64	10.28 \pm 2.82
	>3	31	Media (\pm DE)	53.37 \pm 12.43	27.77 \pm 10.43	10.38 \pm 3.65

Tabla 3. Medias (\pm desviación estándar) para la velocidad curvilínea en la población total de espermatozoides analizados (VCL total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (VCL lentos), medios (VCL medios) o rápidos (VCL rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 3. Mean (\pm standard deviation) values of curvilinear velocity (VCL) for the whole sperm population (VCL total) and for subpopulations of slow (VCL lentos), medium (VCL medios) and rapid spermatozoa (VCL rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		VCL total ($\mu\text{m/s}$)	VCL lentos ($\mu\text{m/s}$)	VCL medios ($\mu\text{m/s}$)	VCL rápidos ($\mu\text{m/s}$)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	128.89 \pm 16.90	38.69 \pm 3.26	91.35 \pm 5.94	162.20 \pm 11.86
	>3	29	Media (\pm DE)	126.01 \pm 19.95	40.81 \pm 2.25	93.51 \pm 2.80	161.01 \pm 13.05
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	127.78 \pm 13.85	40.02 \pm 1.95	94.62 \pm 1.79	158.55 \pm 9.44
	>3	31	Media (\pm DE)	128.34 \pm 15.95	39.88 \pm 1.94	94.28 \pm 2.42	160.76 \pm 10.89

Tabla 4. Medias (\pm desviación estándar) para la velocidad rectilínea en la población total de espermatozoides analizados (VSL total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (VSL lentos), medios (VSL medios) o rápidos (VSL rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 4. Mean (\pm standard deviation) values of straight line velocity (VSL) for the whole sperm population (VSL total) and for subpopulations of slow (VSL lentos), medium (VSL medios) and rapid spermatozoa (VSL rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		VSL total ($\mu\text{m/s}$)	VSL lentos ($\mu\text{m/s}$)	VSL medios ($\mu\text{m/s}$)	VSL rápidos ($\mu\text{m/s}$)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	82.14 \pm 11.79	17.33 \pm 2.99	54.24 \pm 6.63	106.69 \pm 9.10
	>3	29	Media (\pm DE)	78.57 \pm 15.06	17.63 \pm 2.88	56.59 \pm 5.34	102.21 \pm 12.86
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	77.68 \pm 11.12	16.77 \pm 2.60	55.50 \pm 4.19	98.38 \pm 10.88
	>3	31	Media (\pm DE)	78.46 \pm 12.14	16.54 \pm 2.81	56.76 \pm 5.91	99.23 \pm 10.68

Tabla 5. Medias (\pm desviación estándar) para la velocidad media en la población total de espermatozoides analizados (VAP total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (VAP lentos), medios (VAP medios) o rápidos (VAP rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 5. Mean (\pm standard deviation) values of average path velocity (VAP) for the whole sperm population (VAP total) and for subpopulations of slow (VAP lentos), medium (VAP medios) and rapid spermatozoa (VAP rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		VAP total ($\mu\text{m/s}$)	VAP lentos ($\mu\text{m/s}$)	VAP medios ($\mu\text{m/s}$)	VAP rápidos ($\mu\text{m/s}$)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	100.24 \pm 13.82	24.73 \pm 3.06	67.99 \pm 6.15	128.48 \pm 10.03
	>3	29	Media (\pm DE)	96.96 \pm 17.48	25.40 \pm 2.70	70.42 \pm 4.21	125.09 \pm 13.54
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	96.24 \pm 11.98	24.45 \pm 2.24	69.92 \pm 3.72	120.72 \pm 10.63
	>3	31	Media (\pm DE)	97.07 \pm 14.08	24.16 \pm 2.46	70.38 \pm 4.95	122.21 \pm 11.74

Tabla 6. Medias (\pm desviación estándar) para la linealidad en la población total de espermatozoides analizados (LIN total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (LIN lentos), medios (LIN medios) o rápidos (LIN rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 6. Mean (\pm standard deviation) values of linearity (LIN) for the whole sperm population (LIN total) and for subpopulations of slow (LIN lentos), medium (LIN medios) and rapid spermatozoa (LIN rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		LIN total (%)	LIN lentos (%)	LIN medios (%)	LIN rápidos (%)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	63.81 \pm 4.34	43.50 \pm 5.35	59.32 \pm 5.59	65.88 \pm 4.63
	>3	29	Media (\pm DE)	62.18 \pm 4.25	43.05 \pm 5.16	60.48 \pm 4.93	63.38 \pm 4.97
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	60.69 \pm 4.39	41.81 \pm 5.24	58.66 \pm 4.28	61.98 \pm 5.02
	>3	31	Media (\pm DE)	60.99 \pm 3.47	41.38 \pm 5.81	60.13 \pm 5.26	61.64 \pm 3.85

Tabla 7. Medias (\pm desviación estándar) para el índice de rectitud en la población total de espermatozoides analizados (STR total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (STR lentos), medios (STR medios) o rápidos (STR rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 7. Mean (\pm standard deviation) values of straightness (STR) for the whole sperm population (STR total) and for subpopulations of slow (STR lentos), medium (STR medios) and rapid spermatozoa (STR rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		STR total (%)	STR lentos (%)	STR medios (%)	STR rápidos (%)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	81.94 \pm 2.61	69.75 \pm 4.98	79.61 \pm 3.74	83.05 \pm 2.95
	>3	29	Media (\pm DE)	80.93 \pm 2.78	69.11 \pm 4.34	80.21 \pm 3.24	81.59 \pm 3.30
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	80.57 \pm 2.75	68.28 \pm 4.87	79.32 \pm 2.54	81.39 \pm 3.14
	>3	31	Media (\pm DE)	80.75 \pm 2.09	68.11 \pm 5.28	80.47 \pm 3.34	81.14 \pm 2.21

Tabla 8. Medias (\pm desviación estándar) para el índice de oscilación en la población total de espermatozoides analizados (WOB total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (WOB lentos), medios (WOB medios) o rápidos (WOB rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 8. Mean (\pm standard deviation) values of wobble index (WOB) for the whole sperm population (WOB total) and for subpopulations of slow (WOB lentos), medium (WOB medios) and rapid spermatozoa (WOB rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		WOB total (%)	WOB lentos (%)	WOB medios (%)	WOB rápidos (%)
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	77.81 \pm 3.38	62.19 \pm 4.03	74.38 \pm 4.07	79.27 \pm 3.51
	>3	29	Media (\pm DE)	76.76 \pm 2.99	62.12 \pm 3.88	75.29 \pm 3.46	77.57 \pm 3.48
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	75.26 \pm 3.47	61.04 \pm 3.73	73.90 \pm 3.74	76.08 \pm 3.93
	>3	31	Media (\pm DE)	75.49 \pm 3.01	60.52 \pm 4.57	74.60 \pm 3.86	75.93 \pm 3.49

Tabla 9. Medias (\pm desviación estándar) para la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza en la población total de espermatozoides analizados (ALH total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (ALH lentos), medios (ALH medios) o rápidos (ALH rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 9. Mean (\pm standard deviation) values of the amplitude of the lateral head displacement (ALH) for the whole sperm population (ALH total) and for subpopulations of slow (ALH lentos), medium (ALH medios) and rapid spermatozoa (ALH rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		ALH total μ m	ALH medios μ m	ALH rápidos μ m	BCF total Hz	BCF medios Hz	BCF rápidos Hz
Frisona	<3	29	Media (\pm DE)	4.10 \pm 0.49	3.11 \pm 0.30	4.49 \pm 0.44	8.85 \pm 0.78	7 \pm 1.03	9.48 \pm 0.91
	>3	29	Media (\pm DE)	4.11 \pm 0.44	3.09 \pm 0.19	4.63 \pm 0.32	9.24 \pm 0.50	7.37 \pm 1.35	9.86 \pm 0.57
Rubia Gallega	<3	30	Media (\pm DE)	4.28 \pm 0.47	3.18 \pm 0.20	4.72 \pm 0.42	8.80 \pm 0.60	7.20 \pm 0.94	9.38 \pm 0.64
	>3	31	Media (\pm DE)	4.20 \pm 0.39	3.15 \pm 0.21	4.72 \pm 0.34	8.83 \pm 0.74	7.32 \pm 1.22	9.44 \pm 0.76

Discusión

Los toros de razas lecheras se sabe que, en general, producen eyaculados de mayor volumen que los de razas de aptitud cárnica (Cole y Cupps, 1984). Los resultados del presente estudio claramente confirman este hecho, especialmente en el caso de toros mayores de 3 años. La concentración espermática, sin embargo, fue mayor en eyaculados de toros rubios que en los de frisones, y por tanto, el número total de espermatozoides del eyaculado resultó ser similar para ambas razas. Esto probablemente indica

que la diferencia entre las dos razas en el volumen de eyaculado se debe más a una diferencia en la cantidad de plasma seminal, emitido por las glándulas sexuales accesorias durante la eyaculación, que a una diferencia en la producción testicular. De hecho, el número total de espermatozoides presentes en el eyaculado no se vio influido por la raza, pero sí por la edad del toro. Aunque en el presente estudio no se evaluó la circunferencia escrotal o el grado de consistencia del parénquima testicular, sería de esperar que, en general, los sementales de

Tabla 10. Significación (valor de P) del efecto de la raza sobre algunos parámetros descriptores del movimiento de los espermatozoides

Table 10. Significance (P values) of the breed effect on some of the sperm movement descriptors

Raza	Significación
VCL medios	0.003
VSL rápidos	0.006
VAP rápidos	0.013
LIN total	0.005
LIN rápidos	0.001
WOB total	0.002
WOB rápidos	0.000
ALH rápidos	0.024

más de 3 años presentasen un mayor desarrollo testicular que los toros jóvenes, muchos de cuales no habrían completado su crecimiento corporal ni la maduración de sus órganos genitales. El tamaño y el peso del parénquima testicular son parámetros altamente correlacionados con el número total de células de Sertoli (Berndtson et al., 1987), con la producción espermática (Coulter et al., 1976; Madrid et al., 1988), y con la calidad del semen (Bailey et al., 1996) y fertilidad in vivo del semental (Elmore et al., 1976; Coulter and Foote, 1979).

En este trabajo, la motilidad individual media del semen fresco, determinada subjetivamente, osciló entre el 78 y el 83%, mientras que el valor objetivo determinado por el CASA varió entre el 89-91%. Mediante evaluación subjetiva se tendió a subestimar el porcentaje de células móviles aproximadamente en un 10%, y esto probablemente fue debido a que los espermatozoides con menor velocidad, que el CASA clasifica como lentos, visualmente fueron considerados inmóviles. Aunque en semen fresco se han descrito variaciones de entre el 30 y el 60% en la estimación subjetiva de la motilidad en función de la experiencia del técnico (Budworth et al., 1988; Amann, 1989), ésta no ha sido una fuente de variación en este estudio,

puesto que todas las muestras fueron valoradas por la misma persona.

El porcentaje de espermatozoides móviles de un eyaculado o de una dosis de semen congelado está correlacionado con la capacidad fecundante de esa muestra, pero normalmente explica una fracción muy pequeña de la variación en la fertilidad de ese semen. Sin embargo, Farrell et al. (1998) observaron que si se incluían colectivamente varios parámetros determinados con un sistema CASA, especialmente aquellos que mostraban mayores diferencias entre toros, en una ecuación de regresión múltiple, la correlación con la fertilidad del semen permitía explicar hasta el 98% de su varianza.

Los parámetros medios descriptores del movimiento espermático obtenidos en este estudio con el SCA 2002® para semen fresco bovino, son aplicables y repetibles en cualquier laboratorio de análisis seminal, siempre y cuando se utilicen las mismas razas y grupos de edad, así como el mismo equipo de análisis y las mismas condiciones de trabajo. Los resultados obtenidos tras el análisis de las mismas muestras de semen en distintos laboratorios y/o con diferentes equipos pueden ser muy dispares. Estas diferencias son debidas a que los distintos laboratorios pue-

den utilizar distintos settings (nº de imágenes por segundo, límites de tamaño, límites de velocidad para espermatozoides inmóviles, lentos, etc.) y distintas condiciones de análisis (temperatura, diluyentes, tamaño de muestra), pero fundamentalmente se deben a que los distintos equipos a veces utilizan algoritmos muy diferentes para calcular el mismo parámetro cinético, con lo cual es muy probable que en realidad se estén calculando parámetros distintos (Holt et al., 1994). Por otra parte, el usuario es una fuente de variabilidad tan o incluso más importante que la impuesta por las diferencias técnicas existentes entre los distintos equipos (Holt et al., 1994).

En definitiva, los valores medios de los parámetros descriptores del movimiento espermático descritos en este estudio se pretende que sirvan de consulta para los laboratorios de análisis de semen bovino y los centros de IA siempre que dispongan de las mismas razas y del mismo sistema CASA utilizado en este trabajo.

Bibliografía

- Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Del Barrio G, 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60: 32-41.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.* 23: 647-656.
- Amann RP, 1989. Can the fertility potencial of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10: 89-98.
- Anzar M, Hassan MM, Graham EF, Deyo RCM, Singh G, 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology* 36: 307-317.
- Bailey T, Monke D, Hudson R, Wolfe D, Carson R, Riddell M, 1996. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *Theriogenology* 46: 881-887.
- Berndtson W, Igboeli G, Pickett B, 1987. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young bulls. *J. Anim. Sci.* 64: 241-246.
- Budworth RP, Amann RP, Chapman PL, 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.* 9: 41-54.
- Cole HH, Cupps PT, 1984. Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 221-223.
- Coulter G, Rounsaville T, Foote RH, 1976. Heritability of testicular size and consistency in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* 43: 10-11.
- Coulter G, Foote R, 1979. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle. *Theriogenology* 11: 297-311.
- Davis RO, Katz DF, 1993. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 14: 385-394.
- Davis RO, Drobris EZ, Overstreet JW, 1995. Applications of multivariate cluster, discriminant function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.* 63: 1051-1057.
- Elmore R, Bierschwal C, Youngquist R, 1976. Scrotal circumference measurements in 764 beef bulls. *Theriogenology* 6: 485-494.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH, 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49: 871-879.
- Glover FA, 1968. Physical method of measuring the mobility of bull sperm. *Nature* 219:1263.
- Holt WV, Watson PF, Curry M, Holt CH, 1994. Reproducibility of computer-aided semen

- analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil. Steril.* 62 (6): 1277-1282.
- Holt WV, 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 17-24.
- Katz DF, Dott HM, 1975. Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 45: 263.
- Katz DF, Overstreet JW, 1981. Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil. Steril.* 35: 188.
- Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL, 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.* 47(2): 283-291.
- Madrid N, Ott R, Rao D, Parret D, Vanderwert W, Willms C, 1988. Scrotal circumference, seminal characteristics and testicular lesions of yearling Angus bulls. *Am. J. Vet. Res.* 49: 579-584.
- O'Connor MT, Amann RP, Saacke RG, 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J. Anim. Sci.* 53(5): 1368-1376.
- Rodríguez-Martínez H, 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. Chenoweth PJ (ed.) International Veterinary Information service. Ithaca, New York. USA.
- Saacke RG, White JM, 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, p. 22.
- Tardif AL, Farell PB, Trouern-Trend V, Foote RH, 1997. Computer-Assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J. Dairy Sci.* 80: 1606-1612.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.

(Aceptado para publicación el 30 de agosto de 2005).



ELSEVIER

Animal Reproduction Science xxx (2007) xxx–xxx

**ANIMAL
REPRODUCTION
SCIENCE**

www.elsevier.com/locate/anireprosci

Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation

R. Muiño^a, C. Tamargo^b, C.O. Hidalgo^b, A.I. Peña^{a,*}

^a *Unidad de Reproducción y Obstetricia, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela (USC), 27002 Lugo, Spain*

^b *Área de Selección y Reproducción Animal, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), 33203 Somió, Gijón, Asturias, Spain*

Received 26 July 2007; received in revised form 4 October 2007; accepted 8 October 2007

Abstract

The aims of the present study were: (1) to determine the existence of sperm subpopulations with specific motility characteristics in fresh ejaculates from Holstein bulls, (2) to investigate the effects of semen cryopreservation and post-thaw incubation on the distribution of spermatozoa within the different subpopulations, and (3) to evaluate the existence of between-bull variation in the sperm subpopulations structure of fresh and frozen-thawed semen. Six ejaculates were collected from each of 9 Holstein bulls and cryopreserved following a standard protocol. Overall sperm motility and the individual kinematic parameters of motile spermatozoa, determined using a CASA system, were evaluated before freezing and after 0, 2 and 4 h of post-thaw incubation at 37 °C. Data from 16,740 motile spermatozoa, defined by VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH and BCF, were analysed using a multivariate clustering procedure to identify and quantify specific subpopulations within the semen samples. The statistical analysis clustered all the motile spermatozoa into four separate subpopulations with defined patterns of movement: Subpopulation (Subp. 1) moderately slow but progressive spermatozoa (23.2%), (Subp. 2) highly active but non-progressive spermatozoa (16.0%), (Subp. 3) poorly motile non-progressive sperm (35.5%), and (Subp. 4) highly active and progressive sperm (25.3%). Subpopulations 2 and 4 significantly ($P < 0.01$) decreased during cryopreservation and post-thaw incubation (Subp. 2: 21.1%, 18.1%, 8.7% and 5.9%; and Subp. 4: 34.1%, 20.6%, 15.2% and 7.3%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw) whereas Subp. 3 significantly ($P < 0.01$) increased (10.7%, 27.2%, 27.2% and 30.7%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw). The frequency distribution of spermatozoa within subpopulations was quite similar for the 9 bulls, either in fresh or frozen-thawed semen, and differences among bulls were mainly due to differences in the Subp. 4. Significant correlations ($P < 0.01$)

* Corresponding author. Tel.: +34 982 25 23 50; fax: +34 982 28 59 40.

E-mail address: anaipena@lugo.usc.es (A.I. Peña).

were found between the proportions of spermatozoa assigned to Subp. 4 in the fresh ejaculates and those in frozen-thawed semen after 0 ($r=0.473$), 2 ($r=0.513$) and 4 h post-thaw ($r=0.450$). This indicated that the ejaculates with the highest subpopulations of rapid and progressive sperm were also the most resistant to cryopreservation and showed the best post-thaw sperm longevity.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bull semen; Cryopreservation; Kinematic parameters; Sperm subpopulations

1. Introduction

Substantial amount of data supports the hypothesis that any mammalian ejaculate constitutes a heterogeneous population of spermatozoa within which functionally different subpopulations coexist (Curry and Watson, 1994; Harrison, 1996; Holt, 1996; Abaigar et al., 1999). Such heterogeneity makes it possible for the female reproductive tract to exert multiple selective processes which will finally reduce a population of several millions to a few competent spermatozoa (Holt and Van Look, 2004). This concept of sperm heterogeneity has been taken into consideration by many researchers, and various computerized and laboratory methods for sperm quality assessment have been developed, in an attempt to distinguish the subpopulation of potentially competent spermatozoa among the whole sperm population (Evenson et al., 1980; Sailer et al., 1996; Thomas et al., 1997; Abaigar et al., 1999; Thurston et al., 2001; Peña et al., 2005; Rubio-Guillén et al., 2007).

Different sperm subpopulations have been identified in mammalian ejaculates on the basis of the motility characteristics displayed by individual spermatozoa. Studies carried out by several researchers on fresh and frozen-thawed semen from species as diverse as marmosets (Holt, 1996), gazelles (Abaigar et al., 1999, 2001), boars (Abaigar et al., 1999; Quintero-Moreno et al., 2004; Cremades et al., 2005; Rivera et al., 2005, 2006), stallions (Quintero-Moreno et al., 2003), dogs (Nuñez-Martínez et al., 2006a,b) or rabbits (Quintero-Moreno et al., 2007) have demonstrated that, using CASA systems, it is possible to identify and quantify different sperm subpopulations with specific patterns of movement. This can be achieved by using different procedures of multivariate clustering analysis applied to the CASA-derived kinematic parameters obtained for each individual spermatozoon in a semen sample.

In mammals, sperm motility is important for sperm transport within the female reproductive tract and for egg penetration. Distinct sperm populations showing forward progressive motility or, in contrast, non-progressive patterns of movement will have different probability to cross the utero-tubal junction and enter the oviduct (Gaddum-Rosse, 1981; Olds-Clarke, 1986; Shalgi et al., 1992; Scott, 2000). Furthermore, the number of spermatozoa able to traverse the barriers of the female reproductive tract to reach the fertilization site has been demonstrated to be positively associated with the fertility of several domestic species (Overstreet and Adams, 1971; Hunter and Wilmut, 1984; Weitze et al., 1988; DeJarnette et al., 1992; Nadir et al., 1993). Therefore, the identification of sperm subpopulations with a preferential ability to reach the female oviducts might be of utmost importance to improve the accuracy of the sperm quality assessments, and proportions of motile but probably ineffective spermatozoa (non progressive, poorly motile or hyperactivated sperm) could be precisely quantified.

Artificial inseminations in dairy cattle are mainly done with frozen-thawed semen. The cryopreservation process not only induces a loss of sperm viability but also impairs the functionality of the surviving spermatozoa, which accounts for the lower fertilizing capacity of the frozen-thawed

spermatozoa (Watson, 2000). Individual variation in semen freezability is recognized to exist in most domestic species, including the bovine (Parkinson and Whitfield, 1987), and such variation has been related to the incidence of motile (Davis et al., 1995; Nuñez-Martínez et al., 2006a,b) and morphologically (Thurston et al., 2001; Estes et al., 2006; Nuñez-Martínez et al., 2007; Rubio-Guillén et al., 2007) distinct sperm subpopulations present in the fresh ejaculates.

The purpose of this study was to (1) determine the existence of distinct motile sperm subpopulations, as well as their incidence, in fresh bull ejaculates, (2) evaluate the effects of cryopreservation on the frequency distribution of spermatozoa within the different subpopulations, and (3) evaluate between-bull variations in the sperm subpopulations structure of fresh and frozen-thawed semen.

2. Materials and methods

2.1. Animals

A total of 54 ejaculates were collected from 9 Holstein bulls (six ejaculates per bull), with ages between 14 and 24 months. The bulls were in regular AI service housed at the Centro de Inseminación Artificial de Somoio (SERIDA), Gijón, Asturias. The overall 90 day non-return rates of the bulls, as obtained from previous records including all the inseminations (not only first but also second, third and subsequent inseminations), were in the range 45–51%.

2.2. Experimental design

The 9 bulls were collected on the same experimental days, twice a week for 3 successive weeks. After collection and initial evaluation of each ejaculate (to determine its volume, sperm concentration and motility by subjective assessment) an aliquot was removed for computer-assisted evaluation of sperm motility, and the rest of the ejaculate was frozen. The overall sperm motility as well as the kinematic parameters of individual spermatozoa were determined by using a CASA system (Sperm Class Analyzer, Microptic; Barcelona, Spain) to investigate the existence of separate motile subpopulations in fresh bull semen samples. After 2 weeks of storage, the frozen semen was thawed and the CASA-derived motility characteristics were analysed after 0, 2 and 4 h of post-thaw incubation at 37 °C, to evaluate the effect of cryopreservation and post-thaw thermal stress on the distribution of spermatozoa into the different subpopulations.

2.3. Semen collection and freezing

Ejaculates were collected by using an artificial vagina (initial temperature of the water: 45 °C) and evaluated for volume, sperm concentration by using a photometer (Accucell, IMV, L'Aigle, France), and the proportion of total motile spermatozoa by subjective visual assessment. The sperm motility was evaluated after dilution of a semen aliquot with Bioxcell® (IMV, L'Aigle, France) to reach a sperm concentration of approximately 40×10^6 spz/ml. All the ejaculates collected had at least 80% of total motile spermatozoa, as determined subjectively. The same aliquot of diluted semen was then used to determine the sperm motility and the kinematic parameters of individual spermatozoa by means of a CASA system.

Mean (\pm S.D.) values for volume of ejaculates, sperm concentration and total sperm motility (determined subjectively) were: 5.11 ± 1.86 ml, $1183 \pm 343 \times 10^6$ spz/ml and $87 \pm 6\%$, respectively.

The rest of the ejaculate was diluted with Bioxcell® at room temperature (22 °C), at a final sperm concentration of 92×10^6 spz/ml. Extended semen was left to equilibrate in a cooler at 5 °C for 4 h, then it was packaged in 0.25 ml French-straws (23×10^6 spz/straw), and frozen in liquid nitrogen vapours in a programmable freezer following the IMV Digit-cool standard curve for bovine semen (−5 °C/min from +4 °C to −10 °C; −40 °C/min from −10 °C to −100 °C and −20 °C/min from −100 °C to −140 °C).

Thawing was done in a waterbath at 37 °C for 40 s. Three straws per ejaculate were simultaneously thawed, their content was pooled in a 5 ml falcon tube and the thawed semen was incubated at 37 °C in the dark for 4 h.

2.4. Sperm motility evaluation by using a CASA system

The CASA system used was based on the analysis of 16 consecutive, digitalized photographic images which were taken in a time lapse of 0.64 s, which implied a velocity of image-capturing of 1 photograph every 40 ms. Images were taken from 5- μ l semen aliquots, which were placed on slides and covered with 20 \times 20 mm coverslips. Three microscopic fields were analysed in each sample using a phase-contrast microscope supplied with a prewarmed stage at 37 °C and at 200 \times magnification. The number of spermatozoa analysed per sample ranged between 100 and 200, including the immotile sperm. Objects incorrectly identified as spermatozoa were minimized on the monitor by using the playback function. Total motility was defined as the percentage of spermatozoa with mean velocity (VAP) above 10 μ m/s.

The kinematic parameters recorded for each spermatozoon, as described by Mortimer (1997, 2000) were: curvilinear velocity (VCL, μ m/s): the average path velocity of the sperm head along its actual trajectory; straight-line velocity (VSL, μ m/s): the average path velocity of the sperm head along a straight line from its first to its last position; average path velocity (VAP, μ m/s): the average velocity of the sperm head along its average trajectory; percentage of linearity (LIN, %): the ratio between VSL and VCL; percentage of straightness (STR, %): the ratio between VSL and VAP; wobble coefficient (WOB, %): the ratio between VAP and VCL; mean amplitude of lateral head displacement (ALH, μ m): the average value of the extreme side-to-side movement of the sperm head in each beat cycle; and beat cross frequency (BCF, Hz): the frequency with which the actual sperm trajectory crosses the average path trajectory.

2.5. Statistical analysis

Data from all the motile spermatozoa obtained in evaluations of 54 fresh (9 bulls \times 6 ejaculates) and 162 thawed (9 bulls \times 6 ejaculates \times 3 evaluation times) semen samples were imported into a single data set that represented 16,740 spermatozoa, each one defined by the 8 motility descriptors specified above. A multivariate k-means cluster analysis was carried out to classify the 16,740 spermatozoa into a reduced number of subpopulations according to their patterns of movement, so that every spermatozoon belonged to one and only one cluster. Spermatozoa that were very close to each other were assigned to the same cluster, whereas spermatozoa that were far apart were put into different clusters. The k-means clustering model used euclidean distances computed from the 8 quantitative variables, after standardisation of the data (arcsin transformation), so that the cluster centers were the means of the observations assigned to each cluster. The specified number of clusters was based on the previous analysis of hierarchical dendrograms (Holt, 1996) constructed on individual ejaculates using the Ward method. For each ejaculate from each bull, contingency tables were used to determine the percentages of spermatozoa assigned to the different clusters at

the different time points (pre-freezing, 0, 2 and 4 h post-thaw). The effects of cryopreservation, post-thaw incubation time, bull and ejaculate, on the relative distribution frequency of spermatozoa within subpopulations were analyzed using a GLM procedure. The GLM procedure was also used to evaluate the influence of the independent variables on the mean kinematic parameters defining the different sperm subpopulations (i.e. the cluster centers). Differences between means were analysed by Tukey's test. All the statistical analyses were performed using the SPSS 14.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and differences were considered significant at $P < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Overall sperm motility determined by CASA in fresh and frozen-thawed bull spermatozoa

The mean (\pm S.D.) total sperm motility in the fresh semen samples collected from the 9 bulls (6 ejaculates per bull) was $82.3 \pm 9.8\%$, and after semen cryopreservation, it decreased to $75.8 \pm 12.8\%$, $69.8 \pm 16.3\%$ and $59.4 \pm 20.9\%$, respectively, at evaluations done after 0, 2 and 4 h of incubation post-thaw at 37°C . Post-thaw sperm motility after 2 h of incubation was lower ($P < 0.05$) than that recorded pre-freezing, but it was not different from that obtained immediately after thawing (Fig. 1). After 4 h of incubation post-thaw, total sperm motility was lower ($P < 0.05$) than that in fresh and frozen-thawed semen at 0 and 2 h post-thaw.

There were significant differences ($P < 0.01$) between bulls in total sperm motility. In fresh semen (Fig. 2a), bulls 3 and 7 had higher sperm motility than bull 4. However, just after thawing (Fig. 2b), bulls 1, 2 and 9 had significantly higher sperm motilities than bull 7; and after 4 h of incubation post-thaw (Fig. 2d), bull 1 had a significantly higher sperm motility than bulls 3, 6, 7 and 8.

There were no differences in total sperm motility between the different experimental days (when including pooled data across bulls) neither in fresh semen nor immediately after thawing or after 2 or 4 h of post-thaw incubation.

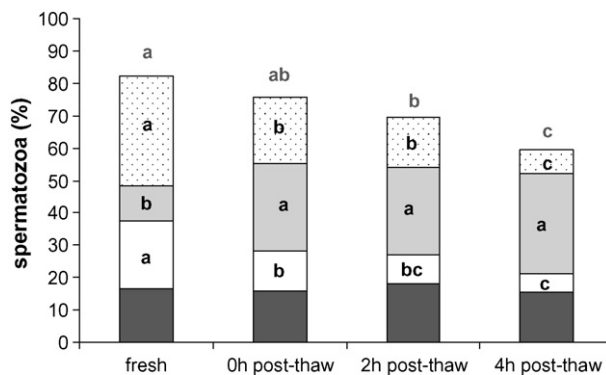


Fig. 1. Relative frequency distribution of motile spermatozoa (mean percentages; $n = 54$) within subpopulations (1: black columns, 2: white columns, 3: grey columns, 4: dotted columns) in fresh and frozen-thawed bull semen samples. Different letters (a–c) inside columns indicate significant differences within subpopulations between evaluation time points (fresh, 0, 2 or 4 h post-thaw). Letters over the columns (a–c) indicate significant differences in total sperm motility between different evaluation time points.

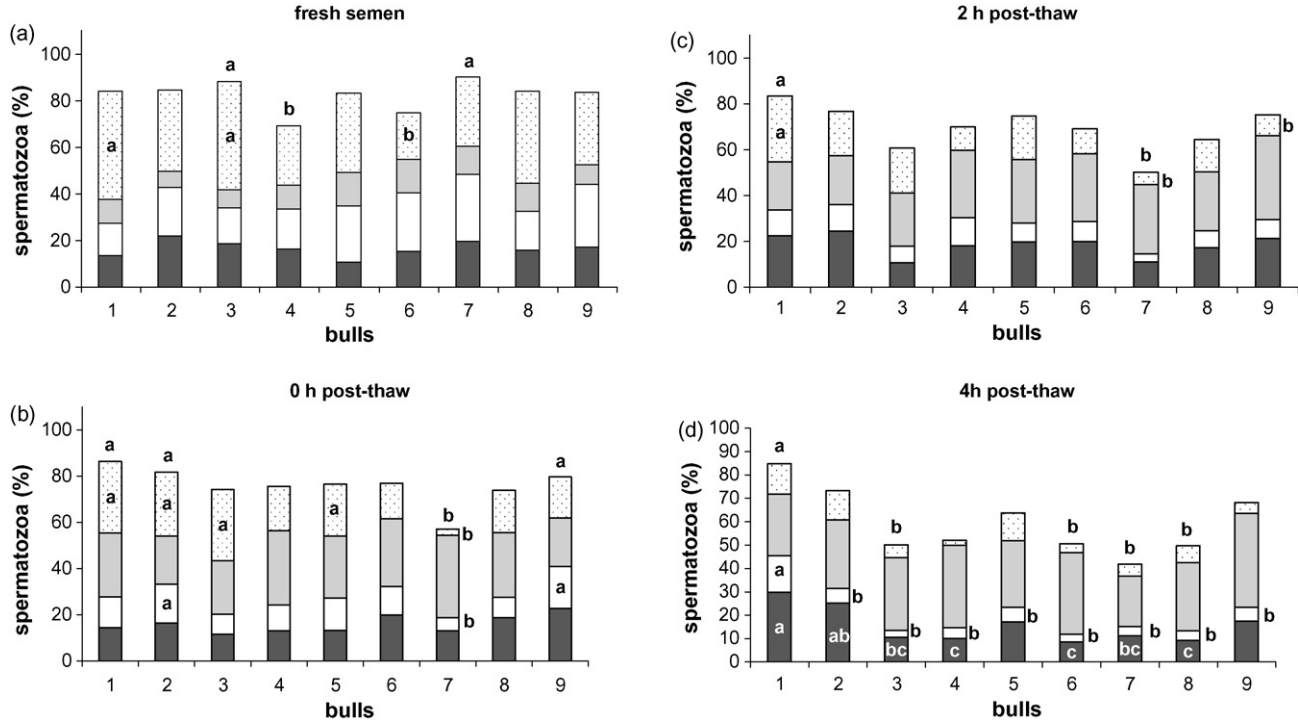


Fig. 2. (a–d) Relative frequency distribution of motile spermatozoa (mean percentages; $n=6$) within subpopulations (1: black columns, 2: white columns, 3: grey columns, 4: dotted columns) between bulls in fresh (a) and frozen-thawed semen after 0 (b), 2 (c) and 4 h (d) of post-thaw incubation at 37 °C. Different letters (a, b and c) inside or by side columns indicate significant differences within subpopulations between bulls. Different letters (a and b) over the columns indicate significant differences in total motility between bulls.

3.2. Motile sperm subpopulations

Four sperm subpopulations were defined after multivariate cluster analysis of the 16,740 individual motile spermatozoa. The motility characteristics of those subpopulations are shown in Table 1, and their pattern of movement can be described as follows.

Subpopulation 1 represented those spermatozoa with relatively low velocity (medium VCL, VSL and VAP) but with high progressiveness (high LIN, STR, WOB, BCF and low ALH). This population included about 23% of the total motile spermatozoa.

Subpopulation 2 contained highly active but non-progressive spermatozoa, as indicated by the high values of VCL and ALH together with low values of LIN and STR, and moderate BCF. This population might be considered as having an “hyperactivated-like” movement, and about 16% of the total motile spermatozoa were assigned to this subpopulation.

Subpopulation 3 included about 35% of the total spermatozoa, and those were poorly motile and non-progressive, as indicated by the lowest values of VCL, VSL, VAP, ALH and BCF together with the lowest LIN, STR and WOB.

Subpopulation 4, containing about 25% of the total population, represented those spermatozoa which moved most rapidly and progressively, as indicated by the highest values of VCL, VSL, VAP and BCF together with the highest LIN, STR, WOB and moderate ALH.

3.3. Frequency distribution of spermatozoa within subpopulations before and after semen cryopreservation

The proportions of spermatozoa assigned to the 4 subpopulations significantly changed ($P < 0.01$) during cryopreservation (Fig. 1). In fresh semen samples, 34.1% of the total spermatozoa moved very rapidly and progressively (subpopulation 4), but immediately after thawing, only 20.6% of the total spermatozoa showed this type of movement, and after 2 and 4 h of incubation, this subpopulation further decreased to 15.2% and 7.3%, respectively. In contrast, the poorly motile non-progressive sperm (subpopulation 3), that represented 10.7% of all the fresh spermatozoa, increased to 27.2% immediately after thawing, and then it did not significantly vary during post-thaw incubation. In fresh semen samples, 21.1% of the spermatozoa showed a

Table 1

Mean values (and ranges) of the kinematic parameters defining the four subpopulations identified in fresh and frozen-thawed bull semen samples

Kinematic parameters	Sperm subpopulations			
	1	2	3	4
No. spz (%)	3880 (23.2)	2688 (16.0)	5937 (35.5)	4235 (25.3)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	70.1a (10.1–109.3)	118.4 b (66.0–227.2)	29.5 c (10.0–93.0)	131.0d (86.1–254.0)
VSL ($\mu\text{m/s}$)	48.3a (9.9–82.3)	44.6b (8.5–72.1)	8.9c (1.2–26.7)	95.6d (60.1–201.0)
VAP ($\mu\text{m/s}$)	54.3a (10.3–89.9)	76.8b (27.6–168.0)	15.0c (1.9–57.9)	107.5d (73.3–205.2)
LIN (%)	69.8a (32.9–100.0)	38.1b (10.0–65.7)	31.4c (10.0–93.4)	73.9d (30.7–99.5)
STR (%)	88.9a (43.7–100.0)	59.4b (11.7–97.7)	59.2b (13.4–100.0)	89.1a (42.6–99.9)
WOB (%)	78.2a (42.2–100.0)	65.4b (21.1–98.1)	51.5c (10.6–100.0)	82.8d (44.8–99.8)
ALH (μm)	2.3a (0.3–6.3)	4.6b (1.0–11.8)	1.5c (0.3–5.1)	3.7d (0.6–12.0)
BCF (Hz)	9.0a (0.4–22.0)	7.6b (0.8–20.3)	5.0c (0.0–15.4)	9.5d (1.0–21.7)

Different letters (a–d) indicate significant differences between subpopulations ($P < 0.05$).

“hyperactivated-like” pattern of movement (subpopulation 2), and after thawing, this proportion decreased to 18.1% to further decrease to 8.7% and 5.9%, respectively, after 2 and 4 h of incubation post-thaw. Finally, the proportion of spermatozoa assigned to subpopulation 1 (moderately slow but progressive sperm) did not significantly change during cryopreservation or incubation post-thaw (16.5%, 15.9%, 18.3% and 15.5%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw).

3.4. Effect of individual variability on the frequency distribution of spermatozoa within subpopulations

In fresh semen samples, the proportion of spermatozoa assigned to subpopulation 4 was the only one that significantly varied among bulls ($P < 0.05$), whereas subpopulations 1, 2 and 3 were not different for the 9 bulls (Fig. 2a).

Immediately after thawing (Fig. 2b), subpopulations 2 and 4 had decreased in the 9 bulls in relation to prefreezing values, but such decrease was different ($P < 0.05$) for the different bulls. Subpopulations 1 and 3, however, did not differ among the 9 bulls.

After 2 h of incubation post-thaw (Fig. 2c), differences among bulls in the sperm subpopulations distribution were only due to the proportion of spermatozoa assigned to subpopulation 4. At the end of the incubation period (Fig. 2d), however, subpopulation 4 had decreased considerably in all bulls, and individual differences were mainly due to differences in subpopulation 1.

As described, the bull had a significant effect on the subpopulations distribution of spermatozoa in fresh and frozen–thawed semen samples, however, when data were pooled across bulls, there was no difference between replicates nor significant interaction between bull and replicate.

There was no significant correlation between the total sperm motility in fresh samples and that in frozen–thawed semen either immediately after thawing or after post-thaw incubation. However, significant correlations ($P < 0.01$) were found between the proportions of spermatozoa assigned to subpopulation 4 in the fresh ejaculates and those in frozen–thawed semen after 0 ($r = 0.473$), 2 ($r = 0.513$) and 4 h post-thaw ($r = 0.450$). This subpopulation in fresh semen, was the only one significantly correlated with itself in frozen–thawed semen. Moreover, the percentage of spermatozoa assigned to subpopulation 4 in the fresh ejaculates was significantly correlated ($P < 0.01$) with the total motility ($r = 0.477$) and with the proportion of spermatozoa included in subpopulation 1 ($r = 0.423$) after 4 h of incubation post-thaw.

3.5. Kinematic parameters of spermatozoa within the different subpopulations before and after semen cryopreservation

There were significant differences between fresh and frozen–thawed semen samples in the kinematic parameters defining the four sperm subpopulations (data not shown). In general, such differences indicated that, in the four subpopulations, the sperm velocity parameters (VCL, VSL and VAP) decreased after cryopreservation and also during post-thaw incubation. However, the trajectory of the sperm movement changed in a different way depending on the sperm subpopulation. In subpopulations 2 and 4, the sperm trajectories were more progressive after thawing and during post-thaw incubation than before freezing (higher LIN, STR and BCF), whereas in subpopulations 1 and 3, the sperm trajectories were less progressive immediately after thawing than before freezing, and became even more oscillatory during post-thaw incubation.

The magnitude of the changes in the sperm kinematic parameters was quite similar for the four sperm subpopulations. For example, for spermatozoa assigned to subpopulation 4, mean values (and ranges) of VCL, VSL and VAP changed from 134.6 (86.1–254.0), 97.2 (60.1–201.0) and

111.8 (74.1–205.2) $\mu\text{m/s}$, respectively, before freezing to 118.6 (86.4–196.2), 90.2 (65.0–147.0) and 96.9 (75.2–148.7) $\mu\text{m/s}$, respectively, after 4 h of post-thaw incubation. And mean values (and ranges) of LIN, STR, ALH and BCF changed from 73.3 (30.7–99.5)%, 87.1 (42.6–99.9)%, 3.8 (0.6–11.1) μm and 7.2 (2.0–17.5) Hz, respectively, before freezing to 76.9 (37.0–97.6)%, 93.1 (51.5–99.6)%, 3.3 (0.7–8.3) μm and 12.6 (2.1–21.0) Hz, respectively, after 4 h of post-thaw incubation. Changes of a similar magnitude were observed in the kinematic parameters defining the other three subpopulations.

3.6. Effect of individual variability on the sperm kinematic parameters defining the four sperm subpopulations

There were significant differences among bulls ($P < 0.05$) on the sperm kinematic parameters defining the four subpopulations. For example, for spermatozoa assigned to subpopulation 4, bulls 3 and 9 showed the highest differences. Bull 3 had significantly ($P < 0.05$) higher VCL, VSL, VAP, LIN, WOB and significantly ($P < 0.05$) lower values of ALH and BCF than bull 9 [mean values (and ranges) were VCL: 133.9 (89.7–228.2) versus 127.1 (88.5–206.1) $\mu\text{m/s}$; VSL: 101.5 (63.0–201.0) versus 87.8 (64.0–181.0) $\mu\text{m/s}$; VAP: 113.9 (75.6–202.6) versus 98.2 (73.7–190.8) $\mu\text{m/s}$; LIN: 76.6 (36.3–99.5) versus 70.5 (35.5–95.6)%; WOB: 85.5 (46.5–99.6) versus 78.5 (44.9–99.2)%; ALH: 3.4 (0.9–10.4) versus 3.9 (0.9–9.6) and BCF: 9.2 (1.8–21.0) versus 11.0 (1.7–21.3) Hz].

Differences were also observed among the other bulls in some, but not all, of the kinematic parameters defining the sperm velocity or the trajectory of subpopulation 4. Similar individual variability was observed in the kinematic parameters defining the other 3 subpopulations.

4. Discussion

The results of the present study indicated that four sperm subpopulations were distinguishable in fresh and frozen-thawed bull semen samples, as determined by the 8 kinematic parameters studied. The most interesting finding in this study was that the four sperm subpopulations were quite similarly distributed in the nine bulls, either in fresh or frozen-thawed semen, and differences among bulls were almost exclusively established by the proportion of spermatozoa assigned to the subpopulation of most active and progressive sperm.

From studies in several species, it seems that the presence of three or four well-defined sperm populations is a common finding among mammalian ejaculates (Quintero-Moreno et al., 2003). To our knowledge, the existence of separate motile subpopulations in fresh or frozen-thawed bovine semen has not been previously investigated.

In semen from boars (Quintero-Moreno et al., 2004; Rivera et al., 2005, 2006), rabbits (Quintero-Moreno et al., 2007) and dogs (Nuñez-Martínez et al., 2006a,b), significant differences in the sperm subpopulations structure have been described between-breeds within species. And in a recent study, objective differences in the percentages of total and progressive motility, as well as in the velocity and straightness of spermatozoa, were found in semen from Belgian Blue and Holstein bulls (Hoflack et al., 2007). The authors suggested that a genetic component could be the basis for the breed differences in sperm motility, probably as a result of the world-wide long-term selection of highly fertile Holstein AI bulls (Söderquist et al., 1991). Although in the present study the frequency distribution of spermatozoa within subpopulations was very consistent among bulls and ejaculates, it is likely that different subpopulations could be defined when using bulls of different breeds.

The cryopreservation process had significant effects on the frequency distribution of spermatozoa within subpopulations (Fig. 1). Although different mortality rates in the four sperm subpopulations may account for a change in their frequency distribution, it was obvious that the cryopreservation process modified the motility patterns of the surviving spermatozoa, some spermatozoa being assigned to a different subpopulation. A possible sequence for the progression of spermatozoa through the four subpopulations, similarly to that proposed for gazelle sperm (Abaigar et al., 2001), can be hypothesized. Spermatozoa in subpopulation 4 represent the most rapid and progressive sperm, probably the pattern movement most suitable for being part of the fertilizing population, and this was the majoritary population in fresh ejaculates. After cryopreservation and during post-thaw incubation, some of those spermatozoa might reduce their flagellar activity, probably as a consequence of sublethal cryoinjury, and they would be included into subpopulation 1. Some of the spermatozoa from subpopulation 1, constituted by relatively slow but progressive spermatozoa, might lose the ability to control the semipermeability of their membranes and thereby experience a sort of false hyperactivation (Yanagimachi, 1994), being assigned then to subpopulation 2. Finally, subpopulation 3, constituted by poorly motile non-progressive spermatozoa, could represent a late stage of cell deterioration, probably contributed to by spermatozoa from the other three subpopulations, but most importantly by those from subpopulation 2.

The changes in the sperm subpopulations structure induced by cryopreservation were quite similar for the nine bulls, and differences between bulls were mainly due to subpopulation 4, either in fresh semen, just after thawing or after 2 h post-thaw. Only at the end of the incubation period, it was the subpopulation 1 which established differences among bulls. It is interesting to note that the proportion of spermatozoa included in subpopulation 4 in the fresh ejaculates was significantly correlated with that in thawed semen (at 0 and 2 h post-thaw) and with subpopulation 1 after 4 h of incubation post-thaw. However, the overall motility of the fresh ejaculates showed no correlation at all with total post-thaw motility or with any of the sperm subpopulations obtained after thawing. This indicated that the ejaculates with the highest subpopulations of rapid and progressive sperm were also the most resistant to cryopreservation and showed the best post-thaw sperm longevity. Similar results were also found in human (Davis et al., 1995) and dog ejaculates (Nuñez-Martínez et al., 2006a) and it has been proposed that sperm belonging to clusters with high velocities and more progressive movement can be considered the sperm with the highest fertilizing potential (Quintero-Moreno et al., 2003; Cremades et al., 2005; Nuñez-Martínez et al., 2006a).

As differences among bulls were mainly evidenced by the proportion of spermatozoa included into subpopulation 4, perhaps this subpopulation could also determine differences in their *in vivo* fertility. However, to provide valid measurements of fertility in which a bull accounts for a substantial proportion of the total variance, insemination doses of $0.8\text{--}1.5 \times 10^6$ sperm should be used, to place the results on the dose-responsive rather than on the asymptotic part of the curve (Amann, 1989; Christensen et al., 2005). Insemination doses of about 23×10^6 sperm would largely compensate differences among bulls in the proportions of spermatozoa assigned to subpopulation 4. In such a situation, bull and ejaculate effects would account for less than 1% of the random variation in NRR (Stålhammar et al., 1994; Amann and Hammerstedt, 2002; Christensen et al., 2005).

To evaluate the importance of identifying concrete motile subpopulations in the ejaculates of different bulls, perhaps a first approach should be an *in vitro* estimation of the quality of sperm at the site of fertilization. For example, by using a swim-up procedure (Zhang et al., 1998), differences in the recovered sperm populations after swim-up separation could reflect those

among the ‘competent’ motile subpopulations. In addition, the use of IVF tests could demonstrate differences in the fertilizing capacity of bulls with different proportions of the most interesting subpopulation. Then, if the initial results were positive, a low-dose insemination trial could be carried out to try to establish a threshold number of spermatozoa in subpopulation 4 above which an optimal fertility should be expected. This information could be used to adjust the insemination doses to the minimum threshold required, especially from highly demanded bulls.

In conclusion, the results of the present study indicated that four well-defined motile sperm subpopulations were present in fresh and frozen-thawed semen from Holstein bulls. The cryopreservation process significantly modified the distribution of spermatozoa within subpopulations, and these changes were consistent among bulls and ejaculates. Differences among bulls were almost exclusively established by the subpopulation of spermatozoa with the highest velocity and progressiveness; the magnitude of this subpopulation in fresh ejaculates was positively correlated with their resistance to cryopreservation. Further studies should be conducted to determine the relative importance of the different subpopulations of motile spermatozoa coexisting in a bull semen sample when it comes to predict its *in vivo* fertility.

Acknowledgement

The authors wish to thank the staff of SERIDA for valuable collaboration in this study.

References

- Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A.R., Holt, W.V., 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction* 122, 265–273.
- Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., Del Barrio, G., 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60, 32–41.
- Amann, R.P., 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10, 89–98.
- Amann, R.P., Hammerstedt, R.H., 2002. Detection of differences in fertility. *J. Androl.* 23, 317–325.
- Christensen, P., Boelling, D., Pedersen, K.M., Korsgaard, I.R., Jensen, J., 2005. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. *J. Androl.* 26, 98–106.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., 2005. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J. Androl.* 26, 610–618.
- Curry, M.R., Watson, P.F., 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31, 39–46.
- Davis, R.O., Drobnis, E.Z., Overstreet, J.W., 1995. Application of multivariate cluster, discriminate function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modelling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.* 63, 1051–1057.
- DeJarnette, J.M., Saacke, R.G., Bame, J., Vogler, C.J., 1992. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 484–491.
- Esteso, M.C., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Montoro, V., Quintero-Moreno, A., Garde, J.J., 2006. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 241–246.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131–1133.
- Gaddum-Rosse, P., 1981. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am. J. Anat.* 160, 333–341.
- Harrison, R.A.P., 1996. Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 581–594.
- Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Duchateau, L., 2007. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian Bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 153–161.

- Holt, W.V., 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 17–24.
- Holt, W.V., Van Look, K.J.W., 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 127, 527–535.
- Hunter, R.H.F., Wilmot, I., 1984. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.* 24, 597–608.
- Mortimer, S.T., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update* 3, 403–439.
- Mortimer, S.T., 2000. CASA-practical aspects. *J. Androl.* 21, 515–524.
- Nadir, S., Saacke, R.G., Bame, J.H., Mullins, J., Degelos, S., 1993. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility and embryo quality in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 71, 199–204.
- Nuñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006a. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 408–415.
- Nuñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006b. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J. Androl.* 27, 596–603.
- Nuñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2007. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Int. J. Androl.* 30, 182–189.
- Olds-Clarke, P., 1986. Motility characteristics of sperm from the uterus and oviducts of female mice after mating to congenic males differing in sperm transport and fertility. *Biol. Reprod.* 34, 453–467.
- Overstreet, J.W., Adams, C.E., 1971. Mechanisms of selective fertilization in the rabbit: sperm transport and viability. *J. Reprod. Fertil.* 26, 219–231.
- Parkinson, T.J., Whitfield, C.H., 1987. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 27, 781–797.
- Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Nuñez-Martínez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H., 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post-thaw quality. *J. Androl.* 26, 716–723.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A.T., Rodríguez-Gil, J.E., 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973–1990.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61, 673–690.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 312–319.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Palomo, M.J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2005. Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology* 64, 934–946.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2006. Effects of constant, 9 and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 386–393.
- Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J.J., Estes, M.C., Fernández-Santos, M.R., Rodríguez-Gil, J.E., Madrid-Bury, N., Quintero-Moreno, A., 2007. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 354–357.
- Sailer, B.L., Jost, L.K., Evenson, D.P., 1996. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 24, 167–173.
- Scott, M.A., 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 337–348.
- Shalgi, R., Smith, T., Yanagimachi, R., 1992. A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biol. Reprod.* 46, 419–424.
- Söderquist, L., Janson, L., Larsson, K., Einarsson, S., 1991. Sperm morphology and fertility in AI bulls. *J. Vet. Med. A* 38, 534–543.
- Stålhammar, E.M., Janson, L., Philipsson, J., 1994. The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. *Reprod. Nutr. Dev.* 34, 37–45.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56, 991–998.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., Holt, W.V., 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22, 382–394.
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 481–492.

- Weitze, K.F., Rath, D., Pena Alfaro, C.E., Androde Moura, C.J., Scheid, I., 1988. Influence of different sperm number and seminal plasma in the inseminate upon number of accessory spermatozoa in pig embryos. In: 10th Int. Pig Vet. Soc. Proc., Rio de Janeiro, p. 313.
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd., New York, pp. 189–317.
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez-Martínez, H., 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int. J. Androl.* 21, 1–10.



ELSEVIER

Animal Reproduction Science xxx (2008) xxx–xxx

**ANIMAL
REPRODUCTION
SCIENCE**

www.elsevier.com/locate/anireprosci

Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen

R. Muiño^a, M.M. Rivera^b, T. Rigau^b,
J.E. Rodriguez-Gil^b, A.I. Peña^{a,*}

^a Unit of Reproduction and Obstetrics, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine of Lugo, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

^b Unit of Animal Reproduction, Department of Animal Medicine and Surgery, School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

Received 13 June 2007; received in revised form 21 November 2007; accepted 23 November 2007

Abstract

The aim of the present study was to evaluate three thawing rates for bull semen frozen in 0.25-ml straws: placing the straws in a water bath at 37 °C for 40 s, at 50 °C for 15 s or at 70 °C for 5 s. In a first experiment, the three thawing rates were compared in relation to post-thaw sperm motility, determined subjectively, and sperm plasma and acrosomal membrane integrity, examined by flow cytometry, after 0 and 5 h of incubation at 37 °C. In a second experiment, the three thawing rates were evaluated based on post-thaw sperm motility, determined using a CASA system, after 0 and 2 h of incubation at 37 °C. In addition, for the motile spermatozoa, the individual motility descriptors were analysed using a multivariate clustering procedure to test the presence of separate sperm subpopulations with specific motility characteristics in the thawed bull semen samples. Finally, it was investigated if the thawing rate had any influence on the relative frequency distribution of spermatozoa within the different subpopulations. In terms of overall post-thaw motility or plasma and acrosomal sperm membrane integrity there were no significant differences between the three thawing methods evaluated. The statistical analysis clustered all the motile spermatozoa into four separate subpopulations with defined patterns of movement: (1) moderately slow and progressive sperm (27%); (2) “hyperactivated-like” sperm (15.4%); (3) poorly motile non-progressive sperm (34.3%); (4) fast and progressive sperm (23.3%). The thawing rate had no significant influence on the frequency distribution of spermatozoa within the four subpopulations, but there was a significant effect ($P < 0.05$) of the interaction between thawing rate and incubation time. Higher proportions of spermatozoa with fast and progressive movement were observed after 2 h of post-thaw incubation when the thawing was at the faster

* Corresponding author. Tel.: +34 982 25 23 50; fax: +34 982 28 59 40.

E-mail address: anaipena@lugo.usc.es (A.I. Peña).

rates (35 °C/40 s: 8.3%, 50 °C/15 s: 18.1% and 70 °C/5 s: 16.5%). Whether this subtle difference might affect to the *in vivo* fertility of the thawed bovine semen is not known.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bull semen; Thawing rates; Kinematic parameters; Sperm subpopulations

1. Introduction

Artificial inseminations in dairy cattle are mainly done with frozen-thawed semen. The rate of thawing significantly affects the sperm survival, and the appropriate thawing rate is thought to be influenced by numerous factors of the cryopreservation procedure such as type of extender, glycerol concentration, packaging method and freezing rate (Rodriguez et al., 1975; Robbins et al., 1976).

According to the bifactorial theory of cryoinjury proposed by Mazur (1965), optimum cell survival requires that the freezing rate be paired with the thawing rate. Although experimental evidence suggests that this theory applies to spermatozoa (reviewed by Watson, 1979), several studies on bull sperm cryopreservation failed to confirm any relationship between freezing and thawing rates. Almquist and Wiggin (1973a,b) and Robbins et al. (1973) concluded that freezing rates are relatively unimportant in affecting post-thaw motility or acrosomal integrity if the semen is thawed rapidly. On the contrary, Rodriguez et al. (1975) found that a slow rate of freezing resulted in low sperm survival independently of the thawing rate.

A variety of studies evaluating a range of different thawing rates for bull semen frozen in straws (Aamdal and Andersen, 1968; Almquist and Wiggin, 1973a,b; Rodriguez et al., 1975; Robbins et al., 1976; Dhami et al., 1992; Nur et al., 2003), have generally concluded that the more rapid thawing rates result in better sperm motility and acrosomal integrity. Even though comparable conception rates may be achieved if sperm dosage is sufficiently high to maintain above threshold sperm numbers, slow thawing rates (as those achieved during thawing at ambient temperature, in a shirt pocket, or in water bath at 20 °C or less) usually result in reduced sperm survival and are not recommended (DeJarnette et al., 2000; DeJarnette and Marshall, 2005). In general, unless specific recommendations are given, bovine semen frozen in straws, irrespective of extender type and cooling rate, is recommended to be thawed in a water bath at 33–35 °C for 30–40 s (DeJarnette et al., 2000; DeJarnette and Marshall, 2005). However, a number of studies have shown that thawing temperatures as high as 60–80 °C could further improve post-thaw motility (Rodriguez et al., 1975; Senger, 1980; Dhami et al., 1992; Nur et al., 2003). Although the use of such a high temperature is far from being a practical method of thawing the straws, especially in field conditions, it appears to cause a lower degree of cellular damage, yet the magnitude of this effect is still uncertain.

Most of the previous studies designed to evaluate thawing procedures for bull spermatozoa were based on the subjective microscopic assessment of post-thaw sperm motility, morphology or membrane integrity. Currently, more objective and precise measurements on functional and structural characteristics of spermatozoa can be achieved using flow cytometry and CASA systems. The application of new technologies available for semen analysis to the re-evaluation of some controversial aspects of the cryopreservation protocols such as, for example, if there is a real advantage in using thawing temperatures higher than 35 °C could allow us to gain new and valuable information.

Substantial amount of data supports the hypothesis that any mammalian ejaculate constitutes a heterogeneous population of spermatozoa within which functionally different subpopulations

coexist (Abaigar et al., 1999). Studies carried out by several researchers in mammalian ejaculates from species as gazelles, boars, stallions, dogs or bulls (Holt, 1996; Abaigar et al., 1999, 2001; Quintero-Moreno et al., 2003, 2004; Cremades et al., 2005; Rivera et al., 2005, 2006; Nuñez-Martínez et al., 2006a, b; Muiño et al., 2007) have identified, using CASA systems, the existence of sperm subpopulations defined by specific movement characteristics.

Forward progressive motility is thought to be required for the efficient passage of spermatozoa through the uterotubal junction for the colonization of the oviductal reservoir, whereas non-progressive, poorly motile or hyperactivated spermatozoa are believed to be unable to migrate efficiently into the oviducts (Gaddum-Rosse, 1981; Olds-Clarke, 1986; Shalgi et al., 1992; Scott, 2000). The identification and quantification of sperm subpopulations with different patterns of movement might be of great importance to help to estimate the fertilizing capacity of bovine semen samples as well as to give new insights to the evaluation of cryopreservation protocols.

The main purposes of the present study were:

- (1) to evaluate two thawing rates faster than the one usually recommended for bull spermatozoa frozen in straws. The two thawing rates chosen were: placing the straws into a water bath at 50 °C for 15 s, or at 70 °C for 5 s. The recommended thawing procedure (placing the straws into a water bath at 35 °C for 40 s) was used as control.
- (2) to determine the presence of separate sperm subpopulations with different patterns of movement in thawed bull semen samples, and to investigate the influence of the thawing rate on the relative frequency distribution of spermatozoa within the different subpopulations.

2. Materials and methods

2.1. Semen collection and freezing

Frozen semen from 10 Holstein bulls, ranging between 15 and 24 months of age, was used. The bulls were in regular AI service housed at the Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia, Xenética Fontao, Lugo (Spain).

Ejaculates were collected using an artificial vagina (inside temperature: 45 °C) and evaluated for volume, sperm concentration by using a photometer (SDM 4; Minitüb, Tiefenbach, Germany), and motility by subjective visual assessment. Semen was extended with Biladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Germany) which was added in two steps: solution A (without glycerol) was added in a first step, at room temperature (20 °C), to obtain a sperm concentration of 160×10^6 spz/ml. Diluted semen was left to equilibrate in a cooler at 4 °C for 18 h, and approximately 1 h before the freezing the same volume of Biladyl® solution B (containing 14% glycerol) at 4 °C was added in three fractions, at 20-min intervals, to obtain a final sperm concentration of 80×10^6 spz/ml. The diluted semen was packaged in 0.25 ml fresh-straws, and frozen in liquid nitrogen vapours in a programmable freezer following the IMV Digit-cool standard curve for bovine semen (−5 °C/min from +4 °C to −10 °C; −40 °C/min from −10 °C to −100 °C; and −20 °C/min from −100 °C to −140 °C).

2.2. Thawing procedures

Three straws from each bull were respectively thawed at the following three rates: (a) 70 °C for 5 s; (b) 50 °C for 15 s; and (c) control: 35 °C for 40 s. Thawing was done by placing the

straws in a water bath at the proper temperature. Immediately after thawing, the content of each straw was emptied in a 5-ml Falcon tube containing 250 μ l of PBS medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) at 37 °C. The sperm suspension was kept at 37 °C during post-thaw incubation.

2.3. Experiment 1

In the first experiment, the effect of the different thawing rates was evaluated based on post-thaw sperm motility (subjectively determined) and plasma and acrosomal membrane integrity assessed immediately after thawing (0 h) and after 5 h of incubation at 37 °C.

Subsamples of 5 μ l were taken to determine the percentage of progressively motile spermatozoa by subjective examination, using a phase-contrast microscope at 200 \times magnification.

The sperm plasma and acrosomal membrane integrity was assessed by flow cytometry, following the staining protocol described by Peña et al. (1999). Subsamples of 200 μ l were taken and stained for flow cytometry as specified below.

2.3.1. Fluorescent staining of spermatozoa

A 10-mM stock solution of Carboxy-SNARF-1 (SNARF) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) in DMSO was prepared and stored frozen in 5- μ l aliquots. Just before use, the DMSO solution was diluted in PBS to a final concentration of 100 μ M. A 1.5-mM stock solution of propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS, and a 2- μ M stock solution of fluorescein isothiocyanate-labelled Peanut agglutinin (FITC-PNA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS were prepared and stored frozen at –20 °C.

Five μ l of PI, 2 μ l of FITC-PNA and 20 μ l of SNARF were added to a 200- μ l aliquot of thawed semen containing approximately 8×10^6 spermatozoa, mixed, and incubated at 37 °C in the dark for 10 min. After incubation, the stained sperm suspensions were further diluted with 300 μ l of PBS at 37 °C and analysed by flow cytometry.

2.3.2. Flow cytometry

Flow cytometric analysis was performed using an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Miami, FL, USA). The stained cells were excited by an air-cooled, 15 mW, argon ion laser operating at 488 nm. Fluorescence data from at least 50,000 events per sample were collected in list mode. The side and forward light scatter parameters were gated, so that only spermatozoa were analysed for fluorescence. Green fluorescence (from FITC) was collected in the FL1 sensor through a 550-nm dichroic long-pass filter and a 530-nm band-pass filter, and the SNARF and PI fluorescences were collected in the FL3 sensor through a 645 nm dichroic long-pass filter and a 620-nm band-pass filter. Data were analysed using the System II program (Coulter Corporation, Miami, FL, USA).

Dot plot cytograms were obtained for FL1 and FL3, and four sperm subpopulations were identified: (1) spermatozoa stained only by SNARF, corresponded to live cells with intact acrosomes; (2) spermatozoa stained by SNARF and FITC-PNA but not by PI, corresponded to live cells with damaged acrosomes; (3) spermatozoa stained by PI and FITC-PNA but not stained by SNARF, indicated dead cells with disrupted acrosomes; (4) spermatozoa only stained by PI, considered dead cells with intact acrosomes. The SNARF and PI-positive cells were both detected in the FL3 sensor; the two populations were easily separated because the PI fluorescence intensity was higher than that of SNARF.

2.4. Experiment 2

As for the first experiment, three straws per bull were respectively thawed at the three thawing rates previously specified. Then, sperm motility characteristics were evaluated with a CASA system (Sperm Class Analyzer, Microptic; Barcelona, Spain) to investigate the existence of separate motile subpopulations in thawed bull semen samples and the influence of the thawing rate on the structure of such sperm subpopulations. The CASA-derived motility characteristics were analysed immediately after thawing (0 h) and after 2 h of incubation at 37 °C.

The CASA system used was based on the analysis of 16 consecutive, digitalized photographic images which were taken in a time lapse of 0.64 s, which implied a velocity of image-capturing of 1 photograph every 40 ms. Images were taken from 5- μ l semen aliquots, which were placed on slides and covered with 20 mm \times 20 mm coverslips. Three microscopic fields were analysed in each sample using a phase-contrast microscope (Olympus® BH2, Olympus Optical Co., Europe) supplied with a prewarmed stage at 37 °C and at 100 \times magnification. The total number of spermatozoa analysed per sample ranged between 100 and 200. Objects incorrectly identified as spermatozoa were minimized on the monitor by using the playback function. Total motility was defined as the percentage of spermatozoa with mean velocity (VAP) above 10 μ m/s.

As described by Mortimer (1997, 2000), the kinematic parameters recorded for each spermatozoon were:

- *curvilinear velocity (VCL, μ m/s)*: the average path velocity of the sperm head along its actual trajectory,
- *straight-line velocity (VSL, μ m/s)*: the average path velocity of the sperm head along a straight-line from its first to its last position,
- *average path velocity (VAP, μ m/s)*: the average velocity of the sperm head along its average trajectory,
- *percentage of linearity (LIN, %)*: the ratio between VSL and VCL,
- *percentage of straightness (STR, %)*: the ratio between VSL and VAP,
- *Wobble coefficient (WOB, %)*: the ratio between VAP and VCL,
- *mean amplitude of lateral head displacement (ALH, μ m)*: the average value of the extreme side-to-side movement of the sperm head in each beat cycle,
- *beat cross frequency (BCF, Hz)*: the frequency with which the actual sperm trajectory crosses the average path trajectory.

2.5. Statistical analysis

In experiment 1, data on sperm motility, plasma membrane integrity and acrosomal status were analysed using the general lineal model (GLM) procedure for repeated measures, considering the effects of time (0 and 5 h), treatment (thawing rate) and the interactions between them.

In experiment 2, the effect of the thawing rate on the overall percentage of motile spermatozoa was evaluated using a GLM for repeated measures. In addition, data from all the motile spermatozoa analysed by the CASA system were imported into a single data set that represented 6115 spermatozoa, each one defined by the eight motility descriptors specified above. A multivariate k-means cluster analysis was carried out to classify the spermatozoa into a reduced number of subpopulations according to their patterns of movement, as described by Holt et al. (1996). The k-means clustering model used euclidean distances computed from the quantitative variables after standardisation of the data, so the cluster centers were the means of the observations assigned

to each cluster. The separation of spermatozoa into clusters was carried out on the total number of spermatozoa obtained in evaluations of 60 thawed semen samples (10 bulls \times 3 thawing rates \times 2 evaluation times). A χ^2 -test procedure was applied to evaluate statistical differences in the percentages of spermatozoa assigned to the different subpopulations, and then a GLM procedure was used to determine the effects of the thawing rate and incubation time, as well as their interaction, on the relative distribution frequency of spermatozoa within subpopulations. The GLM procedure was also used to evaluate the influence of the two independent variables on the mean kinematic parameters defining the different sperm subpopulations (i.e. the cluster centers). Differences between means were analysed by Tukey's test. All the statistical analyses were performed using the SPSS 14.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and differences were considered significant at $P < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Experiment 1

The thawing rate had no significant effect on sperm motility as determined subjectively. At the onset of incubation, proportions of motile spermatozoa thawed at 35 °C for 40 s, at 50 °C for 15 s or at 70 °C for 5 s, were $64.0 \pm 14.5\%$, $59.0 \pm 11.0\%$ and $61.0 \pm 13.3\%$, respectively. After 5 h of incubation, sperm motility decreased ($P < 0.001$) for the three treatments ($7.4 \pm 9.1\%$, $17.4 \pm 11.7\%$ and $6.3 \pm 8.8\%$ for samples thawed at 35 °C for 40 s, at 50 °C for 15 s and at 70 °C for 5 s, respectively) but there was no interaction between thawing rate and incubation time.

The proportions of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membranes, for samples thawed at 35 °C, 50 °C or 70 °C, were $73.4 \pm 15.0\%$, $73.3 \pm 13.3\%$ and $74.4 \pm 7.7\%$, respectively. There was no significant effect of the thawing rate on the sperm plasma and acrosomal membrane integrity. After 5 h of incubation, sperm membrane integrity declined significantly for the three thawing rates ($55.5 \pm 19.9\%$, $62.1 \pm 9.7\%$ and $66.7 \pm 11.0\%$, respectively, for samples thawed at 35 °C, 50 °C and 70 °C), but there was no significant interaction between thawing rate and incubation time.

Immediately after thawing, the proportion of live spermatozoa with damaged acrosomes was lower than 1% for the three thawing rates ($0.08 \pm 0.13\%$, $0.41 \pm 0.26\%$ and $0.81 \pm 0.34\%$, for samples thawed at 35 °C, 50 °C and 70 °C, respectively), and after 5 h of incubation, it was lower than 2.5% ($1.19 \pm 1.03\%$, $0.67 \pm 0.45\%$ and $1.40 \pm 0.48\%$, respectively, for samples thawed at 35 °C, 50 °C or 70 °C). The thawing rate as well as the interaction between thawing rate and incubation time had significant ($P < 0.01$) effects, being 70 °C for 5 s the rate showing higher proportion of live spermatozoa with damaged acrosomes.

3.2. Experiment 2

3.2.1. Total sperm motility

In agreement with results of experiment 1, the thawing rate had no significant effect on the total sperm motility objectively determined with a CASA system ($P = 0.099$). Immediately after thawing, percentages of total motile spermatozoa were $82.7 \pm 7.5\%$, $80.9 \pm 10.3\%$ and $86.1 \pm 6.7\%$, for samples thawed at 35 °C, 50 °C and 70 °C, respectively. After 2 h of incubation at 37 °C, sperm motility decreased significantly ($P = 0.001$) for the three thawing rates ($66.7 \pm 17.1\%$, $67.4 \pm 17.7\%$ and $78.6 \pm 13.8\%$ for samples thawed at 35 °C, 50 °C and 70 °C, respectively), but there was no significant interaction between thawing rate and incubation time.

Table 1

Motility characteristics (mean \pm S.D.) for the four sperm subpopulations identified in thawed bull semen samples ($n = 6115$)

Sperm motility descriptors	Sperm subpopulations			
	1	2	3	4
Number of spz (%)	1650 (27.0)	943 (15.4)	2098 (34.3)	1424 (23.3)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	79.4 \pm 17.7 a	104.4 \pm 24.4 b	28.8 \pm 15.6 c	132.4 \pm 23.6 d
VSL ($\mu\text{m/s}$)	49.9 \pm 13.3 a	31.8 \pm 12.3 b	9.0 \pm 6.0 c	89.2 \pm 20.4 d
VAP ($\mu\text{m/s}$)	57.4 \pm 13.5 a	61.9 \pm 18.0 b	15.9 \pm 8.8 c	102.5 \pm 19.5 d
LIN (%)	63.4 \pm 12.7 a	30.5 \pm 9.7 b	32.8 \pm 16.7 c	68.3 \pm 14.1 d
STR (%)	86.9 \pm 9.3 a	52.3 \pm 16.7 b	56.5 \pm 19.7 c	87.2 \pm 11.3 a
WOB (%)	72.8 \pm 11.0 a	59.7 \pm 12.2 b	56.5 \pm 14.5 c	78.0 \pm 10.4 d
ALH (μm)	2.98 \pm 0.89 a	4.56 \pm 1.21 b	1.49 \pm 0.77 c	4.28 \pm 1.39 d
BCF (Hz)	9.15 \pm 3.45 a	7.28 \pm 2.92 b	5.07 \pm 2.52 c	10.33 \pm 3.10 d

Including data from three thawing treatments and two incubation times a, b, c and d: different letters indicate significant differences between subpopulations ($P < 0.05$).

3.2.2. Motile sperm subpopulations

Four sperm subpopulations were defined after multivariate cluster analysis of the 6115 individual motile spermatozoa. The motility characteristics of those subpopulations are shown in Table 1, and their pattern of movement can be described as follows.

Subpopulation 1 represented those spermatozoa with a relatively low velocity (medium VCL and VAP) but with a high progressiveness (high LIN, STR, WOB and low ALH). This population included 27% of the total motile spermatozoa.

Subpopulation 2 contained highly active but non-progressive spermatozoa, as indicated by the high values of VCL and ALH together with low values of LIN and STR, and moderate BCF. They could be considered as having “hyperactivated-like” movement. About 15% of the total motile spermatozoa were assigned to this subpopulation.

Subpopulation 3 included about 34% of the total spermatozoa, and those were poorly motile and non-progressive. Those spermatozoa showed the lowest values of VCL, ALH and BCF together with low LIN and STR.

Subpopulation 4, containing about 23% of the total population, represented those spermatozoa which moved most rapidly and progressively, as indicated by the highest values of VCL, VAP, LIN, STR and also the highest BCF.

3.2.3. Frequency distribution of spermatozoa within subpopulations according to the thawing method used

The thawing method *per se* had no significant influence on the frequency distribution of spermatozoa within subpopulations, but the interaction between thawing rate and incubation time had a significant effect ($P < 0.05$) on the proportion of spermatozoa assigned to subpopulation 4.

Immediately after thawing (Fig. 1a), semen samples thawed at 35 °C showed the lowest proportion of spermatozoa with “hyperactive-like” movement (subpopulation 2), and the difference with the same subpopulation in samples thawed at 50 °C almost achieved statistical significance ($P = 0.063$).

After 2 h of incubation (Fig. 1b), the semen samples that were thawed at 35 °C showed a significant reduction ($P = 0.017$) of subpopulation 4, but this subpopulation did not significantly change during the incubation when the thawing was at higher rates.

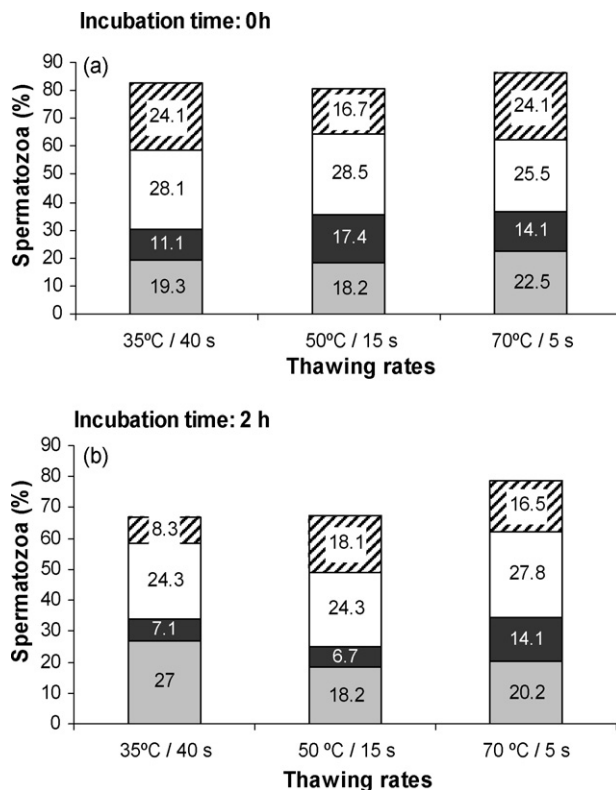


Fig. 1. Relative frequency distribution of motile spermatozoa within subpopulations (1: grey columns, 2: black columns, 3: white columns, 4: striped columns) in bull semen samples thawed at different rates, after 0 h (a) and 2 h (b) of incubation at 37 °C.

Subpopulations 1–3 were not significantly influenced by the interaction between thawing rate and incubation time.

3.2.4. Influence of the thawing method and incubation time on the kinematic parameters defining the four sperm subpopulations

The thawing rate had a significant effect ($P < 0.05$) on some of the kinematic parameters defining the four sperm subpopulations.

Spermatozoa from subpopulations 1 and 2 had more straighten pathways (STR and BCF were significantly higher and WOB significantly lower) when the thawing was at 35 °C for 40 s than at 70 °C for 5 s (Tables 2 and 4). Spermatozoa from subpopulation 3 were even less active (VCL, VSL, VAP and ALH were significantly lower) when the thawing was at 35 °C for 40 s than when it was at 70 °C for 5 s (Tables 2 and 4). And spermatozoa from subpopulation 4 moved faster (VCL, VSL, VAP, ALH and BCF were significantly higher), when the thawing was at 35 °C than when it was at 50 °C or 70 °C (Tables 2–4).

For each of the three thawing rates, the mean values of some kinematic parameters changed significantly ($P < 0.05$) during the 2 h of incubation.

In semen samples thawed at 35 °C (Table 2), there were significant changes in the motility descriptors of the four sperm subpopulations: spermatozoa from subpopulation 1 were a little bit

Table 2

Mean (\pm S.D.) motility characteristics for the four sperm subpopulations identified in bull semen samples thawed at 35 °C for 40 s, after 0 and 2 h of incubation at 37 °C

	Sperm subpopulations							
	1		2		3		4	
Incubation time (h)	0	2	0	2	0	2	0	2
Number of spz (%)	271 (23.4)	351 (40.5)	155 (13.4)	92 (10.6)	394 (34.0)	315 (36.4)	339 (29.2)	108 (12.5)
VCL (μ m/s)	81.8 \pm 17.3	76.5 \pm 17.8*	111.3 \pm 25.2	93.2 \pm 18.3*	26.8 \pm 14.6	28.7 \pm 16.1	139.9 \pm 25.5	126.2 \pm 20.8*
VSL (μ m/s)	49.5 \pm 12.8	50.1 \pm 13.5	34.5 \pm 13.0	26.6 \pm 10.4*	8.1 \pm 5.5	9.0 \pm 5.5	91.8 \pm 23.6	90.9 \pm 17.6
VAP (μ m/s)	57.2 \pm 13.6	55.8 \pm 13.5	64.1 \pm 19.7	53.3 \pm 14.6*	14.3 \pm 7.7	16.4 \pm 9.5*	106.9 \pm 22.4	100.0 \pm 18.1*
LIN (%)	61.2 \pm 13.2	65.8 \pm 11.7*	31.3 \pm 10.5	28.5 \pm 9.3	31.3 \pm 15.9	34.2 \pm 17.2*	66.3 \pm 14.5	73.0 \pm 13.6*
STR (%)	86.5 \pm 9.4	89.5 \pm 8.3*	55.1 \pm 17.5	50.2 \pm 14.9	55.3 \pm 18.8	57.3 \pm 20.2	85.8 \pm 11.5	91.1 \pm 8.8*
WOB (%)	70.7 \pm 12.1	73.4 \pm 9.7*	58.0 \pm 13.8	57.4 \pm 11.4	55.2 \pm 14.5	58.3 \pm 14.9*	76.9 \pm 11.3	79.9 \pm 11.4*
ALH (μ m)	3.1 \pm 0.9	2.8 \pm 0.7*	4.7 \pm 1.3	4.6 \pm 1.1	1.4 \pm 0.7	1.4 \pm 0.8	4.5 \pm 1.5	3.9 \pm 1.4*
BCF (Hz)	9.7 \pm 3.4	10.1 \pm 3.2	8.0 \pm 3.0	6.8 \pm 2.7*	5.4 \pm 2.5	5.2 \pm 2.6	10.8 \pm 3.1	10.8 \pm 2.4

* $P < 0.05$: significant differences within subpopulation between incubation time.

Table 3
Motility characteristics (mean \pm S.D.) for the four sperm subpopulations identified in bull semen samples thawed at 50 °C for 15 s, after 0 and 2 h of incubation at 37 °C

	Sperm subpopulations							
	1		2		3		4	
Incubation time (h)	0	2	0	2	0	2	0	2
Number of spz (%)	265 (22.5)	213 (27.0)	254 (21.5)	79 (10.0)	417 (35.3)	284 (36.0)	244 (20.7)	212 (26.9)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	81.2 \pm 18.5	77.1 \pm 17.2*	105.1 \pm 24.9	102.7 \pm 24.2	29.3 \pm 15.5	27.0 \pm 14.2*	128.2 \pm 19.6	130.9 \pm 24.9*
VSL ($\mu\text{m/s}$)	48.7 \pm 12.9	51.1 \pm 13.7	32.1 \pm 12.6	32.7 \pm 11.8	9.0 \pm 5.9	9.4 \pm 6.5	82.7 \pm 16.6	95.0 \pm 20.2*
VAP ($\mu\text{m/s}$)	56.9 \pm 13.3	57.8 \pm 14.0	60.3 \pm 16.7	64.3 \pm 18.1	16.1 \pm 8.7	15.0 \pm 8.6	95.4 \pm 15.2	105.9 \pm 19.1*
LIN (%)	60.6 \pm 11.8	66.7 \pm 12.7*	30.5 \pm 9.5	32.3 \pm 10.2	31.5 \pm 15.6	35.4 \pm 18.2*	65.4 \pm 13.3	73.6 \pm 13.3*
STR (%)	85.6 \pm 9.3	88.2 \pm 8.8*	53.9 \pm 17.1	52.5 \pm 17.5	55.0 \pm 19.2	61.1 \pm 20.1*	86.8 \pm 10.6	90.0 \pm 10.8*
WOB (%)	70.8 \pm 11.0	75.4 \pm 10.1*	58.2 \pm 12.7	63.1 \pm 11.9*	56.2 \pm 14.0	56.2 \pm 15.0	75.1 \pm 10.5	81.6 \pm 8.9*
ALH (μm)	3.1 \pm 0.9	2.8 \pm 0.8*	4.6 \pm 1.2	4.4 \pm 1.4	1.5 \pm 0.8	1.4 \pm 0.7*	4.4 \pm 1.3	3.9 \pm 1.3*
BCF (Hz)	8.7 \pm 3.2	8.8 \pm 3.6	7.5 \pm 3.1	6.9 \pm 3.0	5.0 \pm 2.4	4.7 \pm 2.6	10.4 \pm 2.9	10.6 \pm 3.2

* $P < 0.05$: significant differences within subpopulation between incubation time.

Please cite this article in press as: Muño, R., et al., Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen, Anim. Reprod. Sci. (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.028

Table 4

Motility (mean \pm S.D.) characteristics for the four sperm subpopulations identified in bull semen samples thawed at 70 °C for 5 s, after 0 and 2 h of incubation at 37 °C

	Sperm subpopulations							
	1		2		3		4	
Incubation time (h)	0	2	0	2	0	2	0	2
Number of spz (%)	287 (26.1)	263 (25.7)	180 (16.4)	183 (17.9)	326 (29.6)	362 (35.4)	307 (27.9)	214 (20.9)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	80.8 \pm 17.9	76.9 \pm 16.4*	104.7 \pm 24.3	101.4 \pm 23.3	30.4 \pm 16.4	30.5 \pm 16.6	134.6 \pm 23.4	126.0 \pm 21.3*
VSL ($\mu\text{m/s}$)	49.8 \pm 13.4	48.8 \pm 13.2	32.2 \pm 12.7	30.4 \pm 11.4	9.2 \pm 6.2	9.8 \pm 6.3	89.6 \pm 20.5	85.1 \pm 16.5*
VAP ($\mu\text{m/s}$)	58.7 \pm 13.6	56.4 \pm 13.2*	63.3 \pm 19.8	62.2 \pm 16.0	16.3 \pm 8.7	17.2 \pm 9.8	105.2 \pm 19.7	97.6 \pm 15.1*
LIN (%)	62.3 \pm 12.9	64.0 \pm 13.0	30.7 \pm 9.9	30.0 \pm 9.1	31.5 \pm 15.8	33.6 \pm 17.4	67.5 \pm 14.0	68.8 \pm 14.3
STR (%)	84.6 \pm 9.4	86.5 \pm 9.8*	51.6 \pm 16.3	49.5 \pm 15.2	55.5 \pm 19.0	56.8 \pm 19.7	85.5 \pm 12.1	87.4 \pm 11.1
WOB (%)	73.4 \pm 11.4	73.8 \pm 10.7	60.5 \pm 12.2	61.7 \pm 10.0	55.6 \pm 14.5	57.2 \pm 14.5	78.7 \pm 9.8	78.2 \pm 9.4
ALH (μm)	3.0 \pm 1.0	2.9 \pm 0.9*	4.5 \pm 1.1	4.5 \pm 1.2	1.6 \pm 0.8	1.6 \pm 0.8	4.3 \pm 1.3	4.2 \pm 1.3
BCF (Hz)	8.4 \pm 3.5	9.2 \pm 3.5*	7.0 \pm 2.7	6.9 \pm 2.7	4.9 \pm 2.4	5.1 \pm 2.6	9.7 \pm 3.2	9.9 \pm 3.1

* $P < 0.05$: significant differences within subpopulation between incubation time.

slower (lower VCL and ALH) but more progressive (higher LIN, STR and WOB); sperm from subpopulation 2 showed a less “hyperactive-like” movement (lower VCL, VSL, VAP and BCF); those from subpopulation 3 had higher VAP, LIN and WOB; and spermatozoa from subpopulation 4 were a little less rapid (lower VCL, VAP and ALH) but more linear (higher LIN, STR and WOB). Similar changes were observed in subpopulations 1 and 3 for semen samples thawed at 50 °C, however, spermatozoa from subpopulation 4 were even more rapid and more progressive after 2 h of incubation than immediately after thawing (Table 3). In semen samples thawed at 70 °C, spermatozoa from subpopulations 2 and 3 showed no significant changes in the characteristics of their movement; those from subpopulation 1 showed lower velocity (VCL, VAP and ALH) and higher straightness, and spermatozoa from subpopulation 4 had lower velocity (VCL, VSL and VAP) without significant changes in their trajectories (Table 4).

4. Discussion

The results of the present study indicated that, in terms of total post-thaw sperm motility and integrity of plasma and acrosomal membranes, there was no difference between the three thawing rates compared. These results disagree with previous findings that thawing temperatures higher than 35 °C improved post-thaw sperm motility, acrosomal integrity or sperm morphology (Senger, 1980; Nur et al., 2003). In previous studies, different extenders, glycerol levels and freezing rates were used, and these factors are known to interact to influence the sperm tolerance to a thawing rate (Rodríguez et al., 1975; Robbins et al., 1976).

Four sperm subpopulations were distinguishable in the frozen-thawed bull semen samples used in this experiment, as determined by the eight kinematic parameters studied. The present study confirmed our previous results (Muñio et al., 2007) that described a very similar structure of four sperm subpopulations in fresh and frozen-thawed semen from Holstein bulls. It is noteworthy that the two experiments were performed in two different AI centers and not only the bulls but also the semen cryopreservation protocols were different.

Studies in fresh and frozen-thawed semen of a variety of species (marmosets: Holt, 1996; gazelles: Abaigar et al., 1999, 2001; boars: Abaigar et al., 1999; Quintero-Moreno et al., 2004; Cremades et al., 2005; Rivera et al., 2005, 2006; or stallions: Quintero-Moreno et al., 2003) have identified the presence of three or four sperm subpopulations with specific patterns of movement, and this has been suggested to be a widespread phenomenon among mammalian ejaculates (Quintero-Moreno et al., 2003).

The four subpopulations identified in the present study are thought to represent spermatozoa in different physiological states (Abaigar et al., 1999). A possible sequence for the progression of spermatozoa through the four subpopulations, similar to that proposed for gazelle sperm (Abaigar et al., 2001), can be hypothesized. Spermatozoa in subpopulation 4 represent the most rapid and progressive sperm, probably the pattern movement most suitable for being part of the fertilizing population. During post-thaw thermal stress, some of those spermatozoa may reduce their flagellar activity, probably due to sublethal cryoinjury, although their movement is still forward, and they would be then assigned to subpopulation 1. Some spermatozoa from subpopulation 1, constituted by relatively slow but progressive spermatozoa, might lose structural integrity and the ability to control the selective permeability of their membranes, and convert to the movement pattern of subpopulation 2. Accumulation of intracellular Ca^{2+} above physiological concentrations is believed to cause a hyperactive-like pattern of movement in the spermatozoa (Yanagimachi, 1994). Finally, subpopulation 3, constituted by poorly motile non-progressive spermatozoa, could represent a late stage of cell deterioration, probably contributed

to by spermatozoa from the other three subpopulations, but most importantly by those from subpopulation 2.

In the present study, when post-thaw sperm motility was determined by subjective microscopic assessment it was found to be about 25% lower than that determined by the CASA system. Such proportion fits well with the percentage of spermatozoa included into subpopulation 3, which could have been considered immotile by the subjective observer. The human eye tends to include as motile spermatozoa preferentially those that show clear movements between frames (Holt et al., 1996).

Our results showed that the thawing rate had no significant effects on the mean post-thaw sperm motility or membrane integrity, but it affected to the motile sperm subpopulation structure found after post-thaw incubation. Interestingly, when the thawing was at 35 °C, after 2 h of incubation, the subpopulation 4 was substantially reduced, but it was not when the thawing was at 50 °C, or such reduction was less important when at 70 °C (Fig. 1). This indicated that more severe latent injury was induced to the sperm during the slow than during the rapid thawing, and that thawing at 50 °C was less harmful than at 70 °C.

It seems obvious that spermatozoa from subpopulations 2 and 3 should not be expected to successfully migrate within the cow's oviduct (Gaddum-Rosse, 1981; Olds-Clarke, 1986; Shalgi et al., 1992; Scott, 2000), however, there is not an obvious answer to whether the fertilizing ability of these samples should be expected to reside exclusively in subpopulation 4, or in both, subpopulations 1 and 4. If the fertilizing ability of the semen samples used in the present study were preferentially localized in subpopulation 4, thawing at the higher rates should be recommended. This would mean then, that only around 20% of the thawed spermatozoa present in these samples would have the capacity to progress toward the fertilization site. Alternatively, it is possible that the relatively slow but progressive spermatozoa assigned to subpopulation 1 can also be part of the 'competent' population selected during the sperm transport in the female genital tract. In that case, the three thawing rates would have produced similar proportions of potentially 'competent' spermatozoa. Clearly, the relative importance of the different subpopulations of motile spermatozoa present in a semen sample for predicting its *in vivo* fertility still has to be more deeply investigated.

Some of the kinematic parameters defining the four subpopulations significantly varied depending on the thawing method used. Interestingly, spermatozoa included in subpopulation 4 showed a more rapid and active movement (higher VCL, VSL, VAP, ALH and BCF) when the thawing was at 35 °C than when it was at 50 °C or at 70 °C. Such increased flagellar activity may have induced an earlier exhaustion of these cells, thereby causing the subpopulation 4 to be significantly reduced after incubation.

Our results showed that after a 2-h period of *in vitro* incubation, the kinematic parameters defining the four sperm subpopulations significantly varied, in general to indicate that the swimming velocity of the spermatozoa had decreased. It was interesting to note one exception to this rule in samples thawed at 50 °C (Table 3), for which the subpopulation 4 showed a more rapid and progressive movement after incubation. This effect was probably a consequence of some individual spermatozoa switching into a different subpopulation, but it also indicated that those spermatozoa remaining in subpopulation 4 did not reduce their velocity or progressiveness during post-thaw incubation. Again, this finding suggests that thawing at 50 °C was less harmful than at 70 °C or at 35 °C.

In conclusion, the results of the present study confirmed that different sperm subpopulations with specific patterns of movement are present in frozen-thawed bull semen samples. As shown in fresh or frozen-thawed semen from other mammalian species, the different subpopulations

represented spermatozoa with a different functional status. The three thawing rates evaluated produced similar results in terms of total post-thaw sperm motility or plasma membrane integrity; however, the study of the different sperm subpopulations present in the thawed samples, and especially, of those subpopulation dynamics during post-thaw thermal stress, revealed discrete functional differences between the three thawing procedures. Higher proportions of spermatozoa with fast and progressive movement were observed after post-thaw incubation when thawing at the higher temperatures. Whether this subtle difference might affect to the *in vivo* fertility of the thawed semen is not known. Nevertheless, a detailed study of the sperm subpopulations coexisting in a semen sample might open new possibilities to help to predict its *in vivo* fertility as well as to improve the current cryopreservation protocols.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Centro de Selección y Reproducción Animal the Galicia, Xenética Fontao, for generous donation of the frozen semen, and Minitüb Ibérica for economical support.

References

- Aamdal, J., Andersen, K., 1968. Fast thawing of semen frozen in straws. *Zuchthygiene* 3, 22–24.
- Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., Del Barrio, G., 1999. Sperm subpopulation in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60, 32–41.
- Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A.R., Holt, W.V., 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction* 122, 265–273.
- Almquist, J.O., Wiggin, H.B., 1973a. Effect of different combinations of freezing and thawing rates upon survival of bull spermatozoa in US plastic straws. *A.I. Digest* 21, 10–11.
- Almquist, J.O., Wiggin, H.B., 1973b. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. *A.I. Digest* 21, 12–13.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., 2005. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J. Androl.* 26, 610–618.
- DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., 2005. Straw-thawing method interacts with sire and extender to influence sperm motility and conception rates of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 3868–3875.
- DeJarnette, J.M., Barnes, D.A., Marshall, C.E., 2000. Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristic of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology* 53, 1225–1238.
- Dhami, A.J., Sahni, K.L., Mohan, G., 1992. Effect of various cooling rates (from 30 °C to 5 °C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos Taurus* and *Bos Bubalis* semen. *Theriogenology* 38, 565–574.
- Gaddum-Rosse, P., 1981. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am. J. Anat.* 160, 333–341.
- Holt, W.V., 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 17–24.
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D.M., 1996. Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *J. Androl.* 17, 587–596.
- Mazur, P., 1965. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc.* 24, S175–S182.
- Mortimer, S.T., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update* 3, 403–439.
- Mortimer, S.T., 2000. CASA: practical aspects. *J. Androl.* 21, 515–524.
- Muñio, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Peña, A.I., 2007. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim. Reprod. Sci.*, in press, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.007.
- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006a. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 408–415.

- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006b. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J. Androl.* 27, 596–603.
- Nur, Z., Dogan, I., Soyulu, M.K., Ak, K., 2003. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue Méd. Vét.* 154, 487–490.
- Olds-Clarke, P., 1986. Motility characteristics of sperm from the uterus and oviducts of female mice after mating to congenic males differing in sperm transport and fertility. *Biol. Reprod.* 34, 453–467.
- Peña, A., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C., 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52, 965–980.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A.T., Rodríguez-Gil, J.E., 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973–1990.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61, 673–690.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Palomo, M.J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2005. Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology* 64, 934–946.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2006. Effects of constant, 9- and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 386–393.
- Robbins, R.K., O'Connor, M.L., Chandler, P.T., Saacke, R.G., 1973. Freezing of bovine semen in “frech straws”. *J. Anim. Sci.* 37, 327 (abstract).
- Robbins, P.K., Saacke, R.G., Chandler, P.T., 1976. Influence of freeze rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in frech straws. *J. Anim. Sci.* 42, 145–154.
- Rodríguez, O.L., Berndtson, W.E., Ennen, B.D., Pickett, B.W., 1975. Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.* 41, 129–135.
- Scott, M.A., 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 337–348.
- Senger, P.L., 1980. Handling frozen bovine semen-factors which influence viability and fertility. *Theriogenology* 13, 51–62.
- Shalgi, R., Smith, T., Yanagimachi, R., 1992. A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biol. Reprod.* 46, 419–424.
- Watson, P.F., 1979. *The Preservation of Semen in Mammals*. Oxford Reviews in Reproductive Biology, vol. I. Oxford University Press.
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd., New York, pp. 189–317.

SUMMARY

This thesis is based on the following papers:

Paper 1:

The aim of the present study was to determine the suitability of using two egg yolk-free commercial extenders, Andromed® and Biociphos Plus®, as compared with the Tris-egg yolk based diluent Biladyl®, for the cryopreservation of bull spermatozoa when the freezing protocol involved holding the extended semen at 4°C for 18 h before the freezing.

Six ejaculates from each of 10 Holstein bulls were collected using artificial vagina. Ejaculates were evaluated for volume, sperm concentration and motility, divided in 3 equal volumes, and diluted, respectively, with the 3 extenders specified above. Extended semen was equilibrated for 18 h at 4°C and frozen in 0.25-ml straws.

After thawing, 100 µl-aliquots of semen were labelled with SYBR-14, PI and PE-PNA (Phycoerythrin-conjugated Peanut agglutinin) and analysed by flow cytometry at 0, 3, 6 and 9 h after incubation at 37° C. A General Linear Model procedure for repeated measures was used to determine the effects of extender, bull, replicate and the interaction between them, on sperm viability and acrosomal integrity. Semen samples frozen with Biladyl® showed higher ($P<0.001$) sperm survival after 0h (47.9%) and 9h (30.3%) of incubation than those frozen with Andromed® (38.5% and 17.3%, after 0 and 9h, respectively) or Biociphos Plus® (34.9% and 21.6%, after 0 and 9h, respectively). The bull and replicate had significant effects ($P<0.001$) on both sperm viability and acrosomal integrity, but the interactions between bull and extender and between replicate and extender were not significant. It was concluded that, when holding the semen overnight before freezing, the use of Biladyl® results in higher sperm survival and longevity than the use of Andromed® or Biociphos Plus®.

Paper 2:

For this study, 119 ejaculates from Holstein and Rubia Gallega bulls were used. The semen quality was initially evaluated based on its macroscopic characteristics, collective motility, individual motility and sperm concentration. After evaluation, the ejaculates scored as “not adequate for cryopreservation” were discarded whereas those selected for cryopreservation were analysed by using a CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system. The aim of the present study was to establish medium values for some motility descriptors observed in bovine fresh semen with optimal quality for cryopreservation. The values obtained in this study could be used as a reference by other institutions using a Sperm Class Analyzer equipment (software SCA®2002 Movilidad, Microptic S.L., Barcelona, España).

Paper 3:

The aims of the present study were: 1) to determine the existence of sperm subpopulations with specific motility characteristics in fresh ejaculates from Holstein bulls, 2) to investigate the effects of semen cryopreservation and post-thaw incubation on the distribution of spermatozoa within the different subpopulations, and 3) to evaluate the existence of between-bull variation in the sperm subpopulations structure of fresh and frozen-thawed semen. Six ejaculates were collected from each of 9 Holstein bulls and cryopreserved following a standard protocol. Overall sperm motility and the individual kinematic parameters of motile spermatozoa, determined using a CASA system, were evaluated before freezing and after 0, 2 and 4 h of post-thaw incubation at 37°C. Data from 16,740 motile spermatozoa, defined by VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH and BCF, were analysed using a multivariate clustering procedure to

identify and quantify specific subpopulations within the semen samples. The statistical analysis clustered all the motile spermatozoa into four separate subpopulations with defined patterns of movement: Subpopulation (Subp.) 1) moderately slow but progressive spermatozoa (23.2%), Subp. 2) highly active but non-progressive spermatozoa (16.0%), Subp. 3) poorly motile non-progressive sperm (35.5%), and Subp. 4) highly active and progressive sperm (25.3%). Subpopulations 2 and 4 significantly ($P<0.01$) decreased during cryopreservation and post-thaw incubation (Subp. 2: 21.1%, 18.1%, 8.7% and 5.9%; and Subp. 4: 34.1%, 20.6%, 15.2% and 7.3%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw) whereas Subp. 3 significantly ($P<0.01$) increased (10.7%, 27.2%, 27.2% and 30.7%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw). The frequency distribution of spermatozoa within subpopulations was quite similar for the 9 bulls, either in fresh or frozen-thawed semen, and differences among bulls were mainly due to differences in the Subp. 4. Significant correlations ($P<0.01$) were found between the proportions of spermatozoa assigned to Subp. 4 in the fresh ejaculates and those in frozen-thawed semen after 0 ($r=0.473$), 2 ($r=0.513$) and 4 h post-thaw ($r=0.450$). This indicated that the ejaculates with the highest subpopulations of rapid and progressive sperm were also the most resistant to cryopreservation and showed the best post-thaw sperm longevity.

Paper 4:

The aim of the present study was to evaluate three thawing rates for bull semen frozen in 0.25 ml-straws: placing the straws in a water bath at 37°C for 40 s, at 50°C for 15 s or at 70°C for 5 s. In a first experiment, the 3 thawing rates were compared in relation to post-thaw sperm motility, determined subjectively, and sperm plasma and acrosomal membrane integrity, examined by flow cytometry, after 0 and 5 h of incubation at 37°C. In a second experiment, the three thawing rates were evaluated based on post-thaw sperm motility, determined using a CASA system, after 0 and 2 h of incubation at 37°C. In addition, for the motile spermatozoa, the individual motility descriptors were analysed using a multivariate clustering procedure to test the presence of separate sperm subpopulations with specific motility characteristics in the thawed bull semen samples. Finally, it was investigated if the thawing rate had any influence on the relative frequency distribution of spermatozoa within the different subpopulations. In terms of overall post-thaw motility or plasma and acrosomal sperm membrane integrity there were no significant differences between the 3 thawing methods evaluated. The statistical analysis clustered all the motile spermatozoa into 4 four separate subpopulations with defined patterns of movement. The thawing rate had no significant influence on the frequency distribution of spermatozoa within the 4 subpopulations, but there was a significant effect ($P<0.05$) of the interaction between thawing rate and incubation time. Higher proportions of spermatozoa with fast and progressive movement were observed after post-thaw incubation when the thawing was at the faster rates. Whether this subtle difference might affect to the *in vivo* fertility of the thawed bovine semen is not known.

SUMMARY

This thesis is based on the following papers:

Paper 1:

The aim of the present study was to determine the suitability of using two egg yolk-free commercial extenders, Andromed® and Biociphos Plus®, as compared with the Tris-egg yolk based diluent Biladyl®, for the cryopreservation of bull spermatozoa when the freezing protocol involved holding the extended semen at 4°C for 18 h before the freezing.

Six ejaculates from each of 10 Holstein bulls were collected using artificial vagina. Ejaculates were evaluated for volume, sperm concentration and motility, divided in 3 equal volumes, and diluted, respectively, with the 3 extenders specified above. Extended semen was equilibrated for 18 h at 4°C and frozen in 0.25-ml straws.

After thawing, 100 µl-aliquots of semen were labelled with SYBR-14, PI and PE-PNA (Phycoerythrin-conjugated Peanut agglutinin) and analysed by flow cytometry at 0, 3, 6 and 9 h after incubation at 37° C. A General Linear Model procedure for repeated measures was used to determine the effects of extender, bull, replicate and the interaction between them, on sperm viability and acrosomal integrity. Semen samples frozen with Biladyl® showed higher ($P<0.001$) sperm survival after 0h (47.9%) and 9h (30.3%) of incubation than those frozen with Andromed® (38.5% and 17.3%, after 0 and 9h, respectively) or Biociphos Plus® (34.9% and 21.6%, after 0 and 9h, respectively). The bull and replicate had significant effects ($P<0.001$) on both sperm viability and acrosomal integrity, but the interactions between bull and extender and between replicate and extender were not significant. It was concluded that, when holding the semen overnight before freezing, the use of Biladyl® results in higher sperm survival and longevity than the use of Andromed® or Biociphos Plus®.

Paper 2:

For this study, 119 ejaculates from Holstein and Rubia Gallega bulls were used. The semen quality was initially evaluated based on its macroscopic characteristics, collective motility, individual motility and sperm concentration. After evaluation, the ejaculates scored as “not adequate for cryopreservation” were discarded whereas those selected for cryopreservation were analysed by using a CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system. The aim of the present study was to establish medium values for some motility descriptors observed in bovine fresh semen with optimal quality for cryopreservation. The values obtained in this study could be used as a reference by other institutions using a Sperm Class Analyzer equipment (software SCA®2002 Movilidad, Microptic S.L., Barcelona, España).

Paper 3:

The aims of the present study were: 1) to determine the existence of sperm subpopulations with specific motility characteristics in fresh ejaculates from Holstein bulls, 2) to investigate the effects of semen cryopreservation and post-thaw incubation on the distribution of spermatozoa within the different subpopulations, and 3) to evaluate the existence of between-bull variation in the sperm subpopulations structure of fresh and frozen-thawed semen. Six ejaculates were collected from each of 9 Holstein bulls and cryopreserved following a standard protocol. Overall sperm motility and the individual kinematic parameters of motile spermatozoa, determined using a CASA system, were evaluated before freezing and after 0, 2 and 4 h of post-thaw incubation at 37°C. Data from 16,740 motile spermatozoa, defined by VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH and BCF, were analysed using a multivariate clustering procedure to

identify and quantify specific subpopulations within the semen samples. The statistical analysis clustered all the motile spermatozoa into four separate subpopulations with defined patterns of movement: Subpopulation (Subp.) 1) moderately slow but progressive spermatozoa (23.2%), Subp. 2) highly active but non-progressive spermatozoa (16.0%), Subp. 3) poorly motile non-progressive sperm (35.5%), and Subp. 4) highly active and progressive sperm (25.3%). Subpopulations 2 and 4 significantly ($P<0.01$) decreased during cryopreservation and post-thaw incubation (Subp. 2: 21.1%, 18.1%, 8.7% and 5.9%; and Subp. 4: 34.1%, 20.6%, 15.2% and 7.3%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw) whereas Subp. 3 significantly ($P<0.01$) increased (10.7%, 27.2%, 27.2% and 30.7%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw). The frequency distribution of spermatozoa within subpopulations was quite similar for the 9 bulls, either in fresh or frozen-thawed semen, and differences among bulls were mainly due to differences in the Subp. 4. Significant correlations ($P<0.01$) were found between the proportions of spermatozoa assigned to Subp. 4 in the fresh ejaculates and those in frozen-thawed semen after 0 ($r=0.473$), 2 ($r=0.513$) and 4 h post-thaw ($r=0.450$). This indicated that the ejaculates with the highest subpopulations of rapid and progressive sperm were also the most resistant to cryopreservation and showed the best post-thaw sperm longevity.

Paper 4:

The aim of the present study was to evaluate three thawing rates for bull semen frozen in 0.25 ml-straws: placing the straws in a water bath at 37°C for 40 s, at 50°C for 15 s or at 70°C for 5 s. In a first experiment, the 3 thawing rates were compared in relation to post-thaw sperm motility, determined subjectively, and sperm plasma and acrosomal membrane integrity, examined by flow cytometry, after 0 and 5 h of incubation at 37°C. In a second experiment, the three thawing rates were evaluated based on post-thaw sperm motility, determined using a CASA system, after 0 and 2 h of incubation at 37°C. In addition, for the motile spermatozoa, the individual motility descriptors were analysed using a multivariate clustering procedure to test the presence of separate sperm subpopulations with specific motility characteristics in the thawed bull semen samples. Finally, it was investigated if the thawing rate had any influence on the relative frequency distribution of spermatozoa within the different subpopulations. In terms of overall post-thaw motility or plasma and acrosomal sperm membrane integrity there were no significant differences between the 3 thawing methods evaluated. The statistical analysis clustered all the motile spermatozoa into 4 four separate subpopulations with defined patterns of movement. The thawing rate had no significant influence on the frequency distribution of spermatozoa within the 4 subpopulations, but there was a significant effect ($P<0.05$) of the interaction between thawing rate and incubation time. Higher proportions of spermatozoa with fast and progressive movement were observed after post-thaw incubation when the thawing was at the faster rates. Whether this subtle difference might affect to the *in vivo* fertility of the thawed bovine semen is not known.